

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Phäno- und Genotypisierung von *Escherichia coli* O157-
Stämmen aus unterschiedlichen Habitaten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Cláudia Luzia Quintero Botero

Gießen 2003

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Phäno- und Genotypisierung von *Escherichia coli* O157-Stämmen
aus unterschiedlichen Habitaten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
CLÁUDIA LUZIA QUINTERO BOTERO
Tierärztin aus São José dos Campos-SP, Brasilien

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bülte

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2003

Kenio e Papitos

Kenio und Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	2
2.2	Gesundheitlich bedenkliche <i>E. coli</i>.....	3
2.2.1	Verotoxinogene <i>E. coli</i> (VTEC).....	7
2.2.1.1	Historie.....	7
2.2.1.2	Wirkung und Unterscheidung der Verotoxine.....	8
2.2.1.3	Einflüsse auf die Verotoxinbildung	12
2.2.1.4	Weitere Charakterisierung der VTEC.....	13
2.2.2	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	14
2.2.2.1	Ursprung und Definition	14
2.2.2.2	Virulenzfaktoren	15
2.2.2.3	Serotypenvielfalt.....	18
2.2.2.4	Tenazität	18
2.2.2.5	<i>E. coli</i> -Serotypen O157:H7 und O157:H ⁻	19
2.2.2.5.1	Evolution und Virulenzprofil	19
2.2.2.5.2	Tenazität.....	23
2.2.2.6	Bedeutung von <i>E. coli</i> O157 als Krankheitserreger beim Menschen ..	28
2.2.2.6.1	Klinisches Bild einer EHEC-Infektion	32
2.2.2.6.2	Der Mensch als symptomloser Ausscheider.....	33
2.2.2.6.3	Therapie.....	34
2.2.2.7	Bedeutung als Krankheitserreger für das Tier.....	36
2.2.2.8	Vorkommen bei Tieren.....	36
2.2.2.9	Lebensmittel als Vektoren	47
2.2.2.10	Andere Übertragungswege.....	55

2.2.2.11	Typisierung von <i>E. coli</i> O157	56
2.2.2.11.1	Methoden zur Phänotypisierung	56
2.2.2.11.2	Methoden zur Genotypisierung	58
3	MATERIAL UND METHODEN.....	66
3.1	Anzahl und Herkunft der untersuchten <i>Escherichia coli</i> O157 – Stämme..	66
3.1.1	Laborstämme.....	66
3.1.2	Wildstämme	66
3.2	Nährmedien und Supplemente	66
3.3	Material und Laborgeräte	67
3.4	Chemikalien.....	69
3.5	Puffer und Lösungen.....	70
3.5.1	Puffer und Lösungen für die Polymerasekettenreaktion	70
3.5.2	Agarose und Puffer für die konventionelle Elektrophorese	71
3.5.3	Puffer und Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese	72
3.5.4	Puffer und Lösungen für die Southern-Blot-Hybridisierung.....	73
3.6	Serotypisierung.....	75
3.7	Biochemische Charakterisierung auf dem HC-Agar (SZABO et al., 1986)	75
3.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	76
3.8.1	DNA-Präparation für die PCR.....	76
3.8.2	Durchführung der PCR	77
3.8.3	Verwendete Oligonucleotid-Primer und Thermocycler– Temperaturprogramme	77
3.8.4	Nachweis von <i>vtx2</i> und <i>vtx2c</i> durch Verdau nach der PCR.....	79
3.8.5	Agarosegelelektrophorese.....	79
3.8.6	Ethidiumbromidfärbung.....	80

3.8.7	Photographische Darstellung und Dokumentation.....	80
3.9	Pulsfeldgelelektrophorese	80
3.9.1	Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA	80
3.9.1.1	Einbettung der Zellen in Agaroseblöckchen.....	80
3.9.1.2	Lyse der eingebetteten <i>E. coli</i> -Zellen und Deproteinisierung	81
3.9.1.3	Verdau der <i>E. coli</i> -DNA mit Restriktionsendonukleasen	81
3.9.2	Vorbereitung des Gels für die Pulsfeldgelelektrophorese und Lauf der Elektrophorese.....	82
3.9.3	Auswertung der Pulsfeldgelelektrophorese	83
3.9.4	Analyse der Restriktionmuster von <i>E. coli</i>	83
3.10	<i>p</i>-Gen-Analyse.....	84
3.10.1	DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue“-Kit.....	84
3.10.2	Herstellung Digoxigenin-markierter <i>p</i> -Gen-Sonden	85
3.10.3	Verdau der <i>E. coli</i> -DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	86
3.10.4	Elektrophorese der geschnittenen <i>E. coli</i> -DNA.....	87
3.10.5	Southern-Blot.....	87
3.10.6	Hybridisierung mit <i>p</i> -Gen-Sonde.....	88
3.10.7	Detektion der DNA-Sonden	88
4	ERGEBNISSE.....	89
4.1	Ergebnisse der Serotypisierung.....	89
4.2	Biochemische Eigenschaften der untersuchten <i>E. coli</i> O157-Stämme... 	89
4.3	Verotoxin-Gene	90
4.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis des <i>vtx1</i> -, <i>vtx2</i> - und <i>vtx2c</i> -Gens.....	90
4.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis des <i>vtx1</i> -Gens	91
4.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von <i>vtx2</i> - und <i>vtx2c</i> - Genen.....	92

4.4	Makrorestriktionsanalyse.....	102
4.4.1	<i>Xba</i> I-Verdau.....	102
4.4.1.1	Visuelle Auswertung.....	102
4.4.1.2	Gel Compar-Software Analyse.....	105
4.4.2	<i>Sfi</i> I-Verdau.....	110
4.5	<i>p</i>-Gen-Analyse.....	113
4.6	Zusammenfassende Darstellung.....	117
5	DISKUSSION	121
6	SCHLUßFOLGERUNGEN	132
7	ZUSAMMENFASSUNG	133
8	SUMMARY	136
9	LITERATURVERZEICHNIS	138
10	ANHANG.....	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Nomenklatur und Einteilung von humanpathogenen <i>E. coli</i> -Stämmen, die enterale Erkrankungen hervorrufen können.....	4
Tabelle 2-2: Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von verschiedenen Tierarten (Europa)	38
Tabelle 2-3: Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von verschiedenen Tierarten (Bundesrepublik Deutschland).....	40
Tabelle 2-4: Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von verschiedenen Tierarten (außerhalb von Europa).....	41
Tabelle 2-5: Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Europa).....	50
Tabelle 2-6: Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (außerhalb Europa).....	52
Tabelle 2-7: Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Bundesrepublik Deutschland).....	53
Tabelle 2-8: Primer zur Verotoxintypisierung bei <i>E. coli</i> -Stämme.....	60
Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Oligonucleotidprimer	78
Tabelle 4-1: Biochemische Eigenschaften der 174 untersuchten <i>E. coli</i> O157-Stämme nach 18 h Kultivierung auf HC-Agar	89
Tabelle 4-2: Nachweis von unterschiedlichen <i>vtx</i> -Genen bei 174 <i>E. coli</i> O157-Stämmen unterschiedlicher Herkunft.....	93
Tabelle 4-3: <i>vtx</i> -Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei 70 <i>E. coli</i> O157-Stämmen aus Stuhlproben von Patienten.....	95
Tabelle 4-4: <i>vtx</i> -Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei 12 <i>E. coli</i> O157-Stämmen aus Stuhlproben von symptomlosen Ausscheidern.....	97

Tabelle 4-5: <i>vtx</i> -Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei <i>E. coli</i> O157-Stämmen aus Lebensmitteln	98
Tabelle 4-6: <i>vtx</i> -Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei <i>E. coli</i> O157-Stämmen aus 42 Kotproben von 35 Rindern, sechs von sechs Pferden, zwei von zwei Kälbern und einer von einem Hund....	100
Tabelle 4-7: Beziehung zwischen den 28- <i>Xba</i> I-RFM-Gruppen (insgesamt 118 Stämme) mit Angabe der Stamm-Nummer, dem Probenmaterial und der Herkunft.....	107
Tabelle 4-8: Bandengröße der 19 gefundenen <i>p</i> -Gen-Profile.....	114
Tabelle 4-9: Beziehung zwischen dem <i>p</i> -Gen-Profil, dem <i>Xba</i> I – Restriktionsfragmentmuster, sowie dem minimalen und maximalen Dice-Koeffizient der <i>Xba</i> I-Analyse der 145 untersuchten <i>E. coli</i> O157-Stämme (einschließlich Stamm NCTC 12900)	119

Anhangstabelle 10-1:	Beziehung zwischen der Herkunft von einigen aus Stuhl von Patienten stammenden <i>E. coli</i> O157-Isolaten (n = 70), dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm <i>E. coli</i> O157 EDL 933, dem <i>Xba</i> I – Restriktionsfragmentmuster (RFM) und dem <i>p</i> -Gen-Profil	170
Anhangstabelle 10-2:	Beziehung zwischen dem <i>Xba</i> I – Restriktionsfragmentmuster (RFM) von einigen aus Stuhl von symptomlosen Ausscheidern stammenden <i>E. coli</i> O157-Isolaten (n = 12), der Herkunft, dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm <i>E. coli</i> O157 EDL 933 und dem <i>p</i> -Gen-Profil	176

Anhangstabelle 10-3:	Beziehung zwischen dem <i>Xba</i> I– Restriktionsfragmentmuster (RFM) von einigen aus Lebensmitteln stammenden <i>E. coli</i> O157-Isolaten (n = 41), der Herkunft, dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm <i>E. coli</i> O157 EDL 933 und dem <i>p</i> -Gen-Profil 178
Anhangstabelle 10-4:	Beziehung zwischen dem <i>Xba</i> I– Restriktionsfragmentmuster (RFM) der 51 aus Tierkot stammenden <i>E. coli</i> O157-Isolate, der Herkunft, dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm <i>E. coli</i> O157 EDL 933 und dem <i>p</i> - Gen-Profil 182
Anhangstabelle 10-5:	Beziehung zwischen dem <i>p</i> -Gen-Profil, dem Probenmaterial, sowie dem Isolationsort und –land der 145 untersuchten <i>E. coli</i> O157-Stämme (einschließlich Stamm NCTC 12900) 185
Anhangstabelle 10-6:	Beziehung zwischen dem 85 <i>Xba</i> I-RFM, dem <i>p</i> -Gen- Profil, dem PCR-Ergebnis, der β -D-Glucuronidase- Aktivität (MUG) und der Sorbit-Fermentierung der 175 (einschließlich Stamm NCTC 12900) untersuchten <i>E. coli</i> O157-Stämme 186

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Stufenweise Entstehung von EHEC O157:H7 (modifiziert nach Whittam, 1998)	22
Abbildung 4-1:	Beispielhafte Darstellung der Amplifikate von <i>vtx1</i> -, <i>vtx2</i> - und <i>vtx2c</i> -positiven <i>E. coli</i> O157-Stämmen mittels Polymerasekettenreaktion. Die Spuren 2 bis 17 zeigen <i>vtx1</i> - und/oder <i>vtx2</i> - und <i>vtx2c</i> -positive Isolate. Die Spuren 1 und 20 zeigen den Marker VI. Die Spuren 18 und 19 stellen fehlende Reaktion des Kontrollstamms <i>Escherichia coli</i> C600 und der Mastermix-Kontaminationskontrolle dar	90
Abbildung 4-2:	Amplifikate des <i>vtx1</i> -Gens mit einer Größe von 130 bp. Die Spuren 4 bis 5 und 7 bis 10 zeigen <i>vtx1</i> -positive Isolate. Die Spuren 2, 3 und 6 zeigen <i>vtx1</i> -negative Isolate. In Spur 1 ist der Marker XIV aufgetragen	91
Abbildung 4-3:	Amplifikate des <i>vtx2</i> (Varianten <i>vtx2</i> oder/und <i>vtx2c</i>)-Gens mit einer Größe von 270 bp. Die Spuren 2 bis 5, 7 bis 16 und 18 bis 19 zeigen <i>vtx2</i> (Varianten <i>vtx2</i> oder/und <i>vtx2c</i>)-positive Isolate. Die Spuren 6 und 17 zeigen <i>vtx2</i> (Varianten <i>vtx2</i> und <i>vtx2c</i>)-negative Isolate. In Spuren 1 und 20 ist der Marker VI aufgetragen	94
Abbildung 4-4:	Nachweis von <i>vtx2c</i> (Amplifikat geschnitten) und <i>vtx2</i> (Amplifikat ungeschnitten mit 270 bp) mit dem <i>HaeIII</i> -Restriktionsenzymverdau nach der Polymerasekettenreaktion. Die Spuren 1 und 2 zeigen <i>vtx2c</i> -positive Isolate (zwei Fragmente mit ca. 128 bp und 142 bp). Die Spuren 4 und 5 zeigen <i>vtx2</i> -positive Isolate. In Spur 3 ist der Marker XIV aufgetragen	94
Abbildung 4-5:	Beispielhafte Darstellung einer <i>XbaI</i> -Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von acht <i>E. coli</i> O157-Stämmen der Gruppe A	103

Abbildung 4-6:	Beispielhafte Darstellung einer <i>Xba</i> I-Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von acht <i>E. coli</i> O157-Stämmen der Gruppe A und B.....	104
Abbildung 4-7:	Beispielhafte Darstellung einer <i>Xba</i> I-Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von neun <i>E. coli</i> O157-Isolaten der Gruppen B und A.....	108
Abbildung 4-8:	Dendrogramm der RFM (n = 85) (einschließlich RFM A63 des Stammes NCTC 12900) der genetischen Verwandtschaft der mittels PFGE bei Verdau mit <i>Xba</i> I untersuchten <i>E. coli</i> O157-Stämme, dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz	109
Abbildung 4-9:	Beispielhafte Darstellung einer <i>Sfi</i> I-Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von neun <i>E. coli</i> O157-Stämmen	111
Abbildung 4-10:	Beispielhafte Darstellung einer <i>Sfi</i> I-Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von acht <i>E. coli</i> O157-Isolaten	112
Abbildung 4-11:	Membran der Southern Blot-Hybridisierung der mit <i>Eco</i> RI geschnittenen genomischen DNA von <i>Escherichia coli</i> O157-Stämmen mit der <i>p</i> -Gen-Sonde. Profile: I, II, III, IV, V, VII VIII, IX, XI, XVII, XVIII und XIX	115
Abbildung 4-12:	Membran der Southern Blot-Hybridisierung der mit <i>Eco</i> RI geschnittenen genomischen DNA von <i>Escherichia coli</i> O157-Stämmen mit der <i>p</i> -Gen-Sonde. Profile: VI, IX, X, XII, XIII, XIV, XV und XVI	116
Abbildung 5-1:	Überblick über verschiedene chromosomale genetische Ereignisse. Darstellung von Insertionen (A-1, B-1), Deletionen (A-2, B-2) und „Rearrangements“ (A-3, B-3) unter stattfindender (jeweils A) oder ausbleibender Einflussnahme (jeweils B) auf eine Restriktionsstelle im Genom; nach Goering, 1998.....	123

Abbildung 5-2:	Darstellung des Einflusses genetischer Ereignisse auf die PFGE-Restriktionsfragmentmuster (nach Goering, 1998): Mitte = epidemiologisches Referenzmuster; A = genetische Ereignisse mit Einfluss auf die Schnittstelle und das Fragmentmuster; B = genetische Ereignisse ohne Einfluss auf die Schnittstelle sowie mit oder ohne Einfluss auf das Fragmentmuster.....	124
----------------	--	-----

Anhangsabbildung 10-1:	Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 40 mittels PFGE (Verdau mit <i>Xba</i> I) untersuchten <i>E. coli</i> O157-Isolaten aus Stuhl von Patienten; enthalten sind alle 40 unterschiedlichen <i>Xba</i> I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)	175
------------------------	---	-----

Anhangsabbildung 10-2:	Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 8 mittels PFGE (Verdau mit <i>Xba</i> I) untersuchten <i>E. coli</i> O157-Isolaten aus Stuhl von symptomlosen Ausscheidern; enthalten sind alle 8 unterschiedlichen <i>Xba</i> I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)	177
------------------------	---	-----

Anhangsabbildung 10-3:	Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 22 mittels PFGE (Verdau mit <i>Xba</i> I) untersuchten <i>E. coli</i> O157-Isolaten aus Lebensmitteln; enthalten sind alle 22 unterschiedlichen <i>Xba</i> I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)	181
------------------------	---	-----

Anhangsabbildung 10-4:	Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 22 mittels PFGE (Verdau mit <i>Xba</i> I) untersuchten <i>E. coli</i> O157-Isolaten aus Tierkot; enthalten sind alle 22 unterschiedlichen <i>Xba</i> I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)	184
------------------------	---	-----

Übersicht relevanter bzw. häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

Aqua bidest.	<u>A</u> qua <u>b</u> idest <u>i</u> llata
bp	<u>b</u> asen <u>p</u> aar
bzw.	<u>b</u> e <u>z</u> iehu <u>n</u> gs <u>w</u> eise
ca.	<u>c</u> ir <u>a</u>
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>N</u> ormung
d. h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EHEC	<u>E</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <u>E.</u> <u>c</u> oli
et al.	<u>e</u> t <u>a</u> lii
g	<u>G</u> ramm
h	<u>h</u> ora
HC	<u>H</u> ämorrhagische <u>C</u> olitis
HUS	<u>H</u> ämolytisch- <u>u</u> rämisches <u>S</u> yndrom
kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> asen
KbE	<u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit(en)
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
kg	<u>K</u> ilogramm
l	<u>L</u> iter
LMBG	<u>L</u> ebens <u>m</u> ittel- und <u>B</u> edarfsgegenstände <u>g</u> esetz
log	dekadischer <u>L</u> ogarithmus
M	<u>M</u> olar
MDa	<u>M</u> ega <u>D</u> alton
mg	<u>M</u> illigramm
min	<u>M</u> inute(n)
ml	<u>M</u> illiliter
mM	<u>M</u> illimolar
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PFGE	<u>P</u> uls <u>f</u> eld <u>g</u> ele <u>e</u> ktrophorese
RFM	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment <u>m</u> uster

RKI	<u>R</u> obert <u>K</u> och-Institut
rpm	<u>r</u> ound <u>p</u> er <u>m</u> inute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s	<u>S</u> ekunde(n)
sog.	<u>s</u> ogenannte
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
V	<u>V</u> olt
VT	<u>V</u> ero <u>t</u> oxin
VTEC	<u>V</u> ero <u>t</u> oxinogene <u>E. coli</u>
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
z. T.	<u>z</u> um <u>T</u> eil
μl	<u>M</u> ikro <u>l</u> iter
μm	<u>M</u> ikro <u>m</u> eter
°C	Grad <u>C</u> elsius
%	Prozent
§	Paragraph
<	kleiner als
>	größer als
≤	kleiner oder gleich
≥	größer oder gleich

1 EINLEITUNG

Verotoxin-bildende *Escherichia (E.) coli* der Serogruppe O157 gelten als Prototyp der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die beim Menschen verschiedene Krankheitsbilder, wie Hämorrhagische Colitis (HC) oder das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), hervorrufen können. Sie haben weltweit Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger. Mittlerweile wird jedoch in zunehmendem Maße von Infektionen durch Tierkontakt oder menschliche Ausscheider berichtet. Große und kleine Wiederkäuer stellen das Hauptreservoir für EHEC dar. Als Hauptpathogenitätsfaktor der EHEC gilt die Bildung von Verotoxinen.

Hinsichtlich der Epidemiologie des Erregers besteht jedoch noch Forschungsbedarf. Auf Basis unterschiedlicher Typisierungsschemata können Bakterien phäno- und genotypisch charakterisiert und verglichen werden, um epidemiologische Zusammenhänge aufzudecken.

In der vorliegenden Arbeit sollten *E. coli* O157-Stämme aus der Sammlung des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (Justus-Liebig-Universität Giessen) mittels biochemischer Schlüsselreaktionen und genotypischer Methoden wie Polymerasekettenreaktion zur Verotoxintypisierung, Pulsfeldgelelektrophorese und *p*-Gen-Analyse untersucht werden.

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, die Ergebnisse der phäno- und genotypischen Charakterisierung der *E. coli* O157-Stämme zu vergleichen, und auf Basis dieser Feindifferenzierung die klonale Identität dieser Stämme aus unterschiedlichen Habitaten zu überprüfen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli (*E. coli*) sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, mesophile und stäbchenförmige Bakterien von einer Größe von ca. 2-6 µm x 1-1,5 µm (Länge x Breite), die zu der Familie der Enterobacteriaceae gehören. Sie bilden überwiegend eine Kapsel und sind beweglich. Die Generationszeit des Keimes beträgt unter optimalen Bedingungen ca. 20 min. Die Spezies *E. coli* ist benannt nach Dr. THEODOR ESCHERICH, der diese 1885 erstmals in einem Vortrag über die Darmbakterien des Neugeborenen und des Säuglings näher beschrieben hat.

Neben *E. coli*, dem wichtigsten Vertreter der Gattung *Escherichia*, sind vier weitere Spezies beschrieben, die sich biochemisch voneinander abgrenzen lassen (HOLT et al., 1994). Dazu gehören *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* und *E. vulneris*.

E. coli werden nach ihren Oberflächen- (O), Kapsel- (K) und Geißel- (H: von Hauch) Antigenen in verschiedene Serotypen eingeteilt (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984). Inzwischen sind 173 O-, 72 H- und 90 K-Antigene bekannt.

Beim Menschen, bei den Säugetieren (Ausnahmen: Meerschweinchen und Chinchilla) und auch bei den Vögeln (Ausnahme: zum Teil Psittaciden) kommen *E. coli* als Bestandteil der natürlichen Darmflora vor. Mit 10^5 bis 10^9 KbE/g Stuhl bzw. Fäzes nehmen sie nur etwa 1 % der Dickdarmflora ein (BURKHARDT, 1992) und werden der Begleitflora zugeordnet. *E. coli* werden bei der Geburt auf das Neugeborene bzw. das Jungtier übertragen; Jungtiere kommen zudem in den ersten Lebenstagen vor allem auch über andere Tiere mit *E. coli* in Kontakt.

Durch die ubiquitäre Verbreitung wird diese Spezies neben den Coliformen als Indikatorkeim zur Feststellung der hygienischen Beschaffenheit von Lebensmitteln und Wasser angesehen (DELISLE und LEY, 1989; HUANG et al., 1997). Der Nachweis

von *E. coli* kann somit ein Beleg von erfolgter oder auch unzureichender "good manufacturing practice (GMP)" sein.

2.2 Gesundheitlich bedenkliche *E. coli*

Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurden zunehmend *E. coli*-Stämme bekannt, die sich als pathogen für den Menschen erwiesen und gerade eine Rolle bei Lebensmittelinfektionen spielten. Weit verbreitet sind hierbei enterale Erkrankungen. Das Vorkommen von pathogenen Erregern stellt besonders in den Entwicklungsländern bei der Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern ein nicht zu unterschätzendes Problem dar (NATARO und KAPER, 1998; LEVINE und EDELMAN, 1984). Auch beim Tier - gerade beim Jungtier - können bestimmte Stämme enterotoxische oder enterotoxämische Enteropathien und Septikämien verursachen (ALEXANDER, 1994). *E. coli* sind beispielsweise als Erreger der Ödemkrankheit der Absetzferkel (Serotypen: vor allem O139:H2-, O138:H2-, O141:H2-Stämme), bei der Kälberruhr und bei Mastitiden (ALEXANDER, 1994; NEMETH et al., 1994; BRADLEY und GREEN, 2001) bekannt.

Neben enteralen Erkrankungen können *E. coli* auch an nicht-enteralen Krankheitsbildern wie Harnwegsinfektionen, Entzündungen der Gallenblase, Pneumonien, Septikämien, Artherosklerosen, Meningitiden und Wundinfektionen beim Menschen beteiligt sein. Sie lassen sich derzeit aufgrund ihrer Klinik, ihrer Epidemiologie und Virulenz-Faktoren in acht Gruppen unterteilen (Tabelle 2-1):

Tabelle 2-1: Nomenklatur und Einteilung von humanpathogenen *E. coli*-Stämmen, die enterale Erkrankungen hervorrufen können

Akronym	Bezeichnung	Unterteilung	Virulenzeigenschaften	Erkrankung
EPEC	<u>E</u> nteropathogene <i>E. coli</i>	Class I, Class II	Adhäsion, Zytotoxine	Säuglingsdiarrhøe
ETEC	<u>E</u> nterotoxinogene <i>E. coli</i>	LT-Stämme, ST-Stämme ¹	Enterotoxine, Haftungsfähigkeit	Cholera-ähnliche Erkrankung, Reisediarrhøe
EIEC	<u>E</u> ntero <u>i</u> nvasive <i>E. coli</i>		Invasivität, Enterotoxine	Ruhr-ähnliche Erkrankung
VTEC	<u>V</u> erotoxinogene <i>E. coli</i>	“low/trace/high level toxin producer”	Verotoxine, (Enterohämolysin)	Diarrhøe
EHEC	<u>E</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <i>E. coli</i>		Verotoxin, Haftungsfähigkeit, Enterohämolysin, (Enterotoxin)	Diarrhøe, HC ² , HUS ³ , TTP ⁴
EAEC	<u>E</u> nteroaggregativen <i>E. coli</i>		Enterotoxine, Haftungsfähigkeit	Diarrhøe
CNEC	<u>C</u> ytotoxic <u>n</u> ecrotizing <i>E. coli</i>	CNF1, CNF2 ⁵	zytotoxische Nekrotisierungsfaktoren; Hämolysin	nicht bekannt
DAEC	<u>D</u> iffuse <u>a</u> dhering <i>E. coli</i>		Adhäsion	(infantile Diarrhøe)
CLDTEC	<u>C</u> yto <u>l</u> ethal <u>d</u> istending <u>t</u> oxin-producing <i>E. coli</i>		Adhäsion, Toxin	infantile Diarrhøe

¹hitzelabiles/-stabiles Toxin²Hämorrhagische Colitis³Hämolytisch-urämisches Syndrom⁴Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura⁵“Cytotoxic Necrotizing Factor type 1 and 2”

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) produzieren Enterotoxine, die als Esps („EPEC-secreted proteins“) bezeichnet werden (NATARO and KAPER, 1998) und zeigen ein Adhäsionsvermögen, welches für die Interaktion zwischen Bakterium und Enterozyt eine große Rolle spielt (GIAMMANCO et al, 1996). „EPEC Class I“ besitzen im Gegensatz zu den „EPEC Class II“ einen spezifischen plasmidkodierten Adhärenzfaktor (EAF: „E. coli adherence factor“), der im Zelltest oder mit Gensonden nachgewiesen werden kann (NATARO et al, 1985a, NATARO et al., 1985b). Die spezifische Adhärenz wird im Zellkulturtest an HeLa- oder HEp-2-Zellen sichtbar. Dabei wird *in vitro* bei HEp-2-Zellen eine lokale Adhärenz beobachtet. *In vivo* treten spezifische „attaching and effacing (ae)“-Läsionen bei Darmepithelzellen der Mukosa auf. Die Pathogenität ist auf den Dünndarm beschränkt. Im Gegensatz zum EAF ist dieses Anheftungsvermögen chromosomal kodiert. Das *eae* („E. coli attaching and effacing“)-Gen ist für EPEC typisch. Stämme bestimmter Serogruppen wie O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O127, O128 und O142 werden den EPEC zugeordnet (NATARO et al., 1985b). Sie treten teilweise (z. B. O26 und O111) aber auch bei der Gruppe der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) auf (GIAMMANCO et al., 1996). Die Bedeutung der EPEC ist in Deutschland im Gegensatz zu den 50er Jahren deutlich zurückgegangen, trotzdem wurden nach RKI-Angaben für das Jahr 2001 bei 3.309 übermittelten *E. coli*-Fälle EPEC-Stämme am häufigsten nachgewiesen (83 %) (ANON., 2002c). In den Entwicklungsländern sind sie noch ein wichtiger Erreger der Säuglingsdiarrhöe (FAGUNDES-NETO und SCALETSKY, 2000).

Enterotoxinogene *E. coli* (ETEC) produzieren hitzestabile (ST) bzw. -labile (LT) Enterotoxine und besitzen spezifische Fimbrien zur Adhäsion. ETEC sind typische Erreger der sogenannten Reisediarrhöe (GUTH, 2000; SCHULTSZ et al., 2000). Die Toxine bewirken eine sekretorische Diarrhöe, die zu einem choleraähnlichen Krankheitsbild führt. 1996 erkrankten in Japan über 800 Personen nach Verzehr von Thunfischpastete. Hier wurde der Serotyp O25:H⁻ nachgewiesen (MITSUDA et al., 1998). Im Allgemeinen sind sie Spezies-spezifisch, d. h. Isolate vom Tier verursachen keine Erkrankung beim Menschen. In Verbindung mit Erkrankungen des Menschen regelmäßig isolierte Stämme gehören den Serotypen O78:H12 und O8:H37 an (ANON., 1995).

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) weisen sich primär durch ihre Plasmid-vermittelte Invasivität, aber auch durch Enterotoxinbildung aus. Es kommt vornehmlich zu wässrigen Durchfällen (Ruhr-ähnliche Erkrankung), bedingt durch die Wirkung der Enterotoxine (NATARO et al., 1995). Unter Vorbehalt kann wie bei EPEC-Stämmen die serologische Bestimmung zur Diagnostik herangezogen werden (BURKHARDT, 1992). Auch mittels Hybridisierung mit *pInv*- („invasion-related plasmid“) Sonde können EIEC-Stämme der Serogruppe O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164 und O167 diagnostiziert werden (GOMES et al., 1987).

Neben den vorstehend genannten drei Hauptgruppen als Erreger von enteralen Erkrankungen spielen die **enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)** eine bedeutsame Rolle (NATARO und KAPER, 1998). Die Gruppe der **verotoxinogenen *E. coli* (VTEC)** mit der Untergruppe der EHEC wird in den Abschnitten 2.2.1 bis einschließlich 2.2.2.10 ausführlich beschrieben.

Die **enteroaggregativen *E. coli* (EAEC)** treten zunehmend als fünfte Hauptgruppe in Erscheinung (ITOH et al., 1997). EAEC stellen besonders ein Problem in Entwicklungsländern dar, als häufige Erreger für persistierende wässrige Diarrhöen (FANG et al., 1995). *In vitro* wird bei HEp-2-Zellen eine aggregative Adhärenz beobachtet (NATARO et al., 1987). Neben dem Haftungsvermögen bildet diese Gruppe zusätzlich plasmidkodierte hitzestabile Enterotoxine (EAST1) (SAVARINO et al., 1991). Eine Übertragung findet möglicherweise auch von Mensch zu Mensch statt; ein Reservoir im Tierbereich ist derzeit nicht bekannt (HUPPERTZ et al., 1997).

Cytotoxic necrotizing *E. coli* (CNEC) sind in den letzten 18 Jahren zunehmend untersucht worden. Sie werden bei Mensch und Tier nachgewiesen, wobei der "Cytotoxic Necrotizing Faktor type 1 (CNF 1)" für den Menschen in der Regel bei extraintestinalen Infektionen und der "type 2 (CNF 2)" eine Rolle für das Kalb bei Durchfallerkrankungen, aber auch bei Septikämien spielt (CAPRIOLI et al., 1987). Der CNF zeigt zytotoxische Aktivität gegenüber HeLa-Zellen und lässt sich in seiner biologischen Aktivität gegen Vero- und CHO-Zellen von Verotoxinen und hitzelablen Enterotoxinen abgrenzen (CAPRIOLI et al., 1983).

Es gibt noch weitere pathogene *E. coli*-Stämme, die der Gruppe der **diffuse adhering *E. coli* (DAEC)** zuzuordnen sind. Sie werden neben Durchfallerkrankungen bei Kindern vor allem auch im Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen nachgewiesen (FORESTIER et al., 1996). DAEC wurden so bezeichnet, weil sie *in vitro* bei HEp-2-Zellen eine „echte“ diffuse Adhärenz zeigen (NATARO et al., 1987).

Cytolethal distending toxin-producing *E. coli* (CLDTEC) spielen ebenso eine untergeordnete Rolle. Sie sind erst seit kurzer Zeit bekannt (ALBERT et al., 1996) und werden nur selten aus Lebensmitteln isoliert (CERQUEIRA et al., 1997). CLDTEC können, wie auch andere diarrhöische *E. coli*, AE-Läsionen verursachen. Nachgewiesen werden diese Erreger im Zusammenhang mit Diarrhöen bei Kindern.

E. coli können Aufgrund divergierender Virulenzprofile mitunter verschiedenen Pathogruppen zugeordnet werden. MORABITO et al. (1998) wiesen z. B. bei einem an dem Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) erkrankten Patienten einen *E. coli* O111:H2-Stamm nach, der nach den Virulenzfaktoren sowohl den EHEC als auch den EAEC zuzuordnen war.

2.2.1 Verotoxinogene *E. coli* (VTEC)

2.2.1.1 Historie

KONOWALCHUK et al. konnten 1977 aus unterschiedlichem Probenmaterial *E. coli* isolieren, die ein bis dahin unbekanntes Zytotoxin produzierten. Im Verozelltest (Verozellen: Nierenepithelzellen der grünen afrikanischen Meerkatze: *Cercopithecus aethiops*) führten diese Zytotoxine zu einer irreversiblen Schädigung dieser Zellen. Dieses war bis dahin sowohl bei den hitzelablen als auch -stabilen Toxinen der ETEC nicht beobachtet worden. Diese neuartige Toxinvariante wurde daher als Verotoxin (VT) bezeichnet, die *E. coli* als verotoxinogene bzw. Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC). Nach KARMALI (1989) sind alle *E. coli* den VTEC zuzuordnen, die in Kulturüberständen Verotoxin bilden. 1982 konnten O'BRIEN et al. eine strukturelle Ähnlichkeit des Verotoxins mit dem Shiga-Toxin, gebildet vom *Shigella dysenteriae* Typ 1, mit einem entsprechenden Antikörper, der gegen Shiga-Toxin gerichtet war, aufzeigen. Beide Holotoxine besitzen den gleichen isoelektrischen Punkt und eine

relative Hitzestabilität. Die Aminosäurezusammensetzung und -sequenz der beiden Toxine ist fast gleich. In der Literatur wurde daher die Bezeichnung Shiga-like-Toxin (SLT) und Shiga-like-Toxin-bildende *E. coli* (SLTEC) eingeführt (O'BRIEN und HOLMES, 1987). ACHESON et al. (1996) weisen schließlich darauf hin, dass beide Termini, Verotoxin (VT) und Shiga-like-Toxin (SLT) bzw. Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) und Shiga-like-Toxin-bildende *E. coli* (SLTEC) nebeneinander verwendet werden könnten.

Es wurden drei Kategorien von STEC beschrieben, die sich aufgrund der Eigenschaft, unterschiedliche Mengen an Toxin zu bilden, unterteilen lassen. Man spricht von den "low-level"-, "moderate-/trace-level"- und "high-level"-Toxinproduzenten (O'BRIEN et al., 1982). Im Zusammenhang mit dem Erkrankungsbild einer Hämorrhagischen Colitis (HC) und einem Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) werden fast ausschließlich "high-level"-STEC nachgewiesen.

2.2.1.2 Wirkung und Unterscheidung der Verotoxine

Verotoxin ist ein starkes Zellgift, das neben dem Botulinum-Toxin und einigen Mykotoxinen als eines der potentesten natürlichen Toxine gilt (APPEL et al., 1989). Die Toxine bestehen aus einer aktiven Untereinheit A (A: 32 kDa), wobei ein größerer Teil dieser Untereinheit (A₁: 28 kDa) enzymatisch wirksam ist und der andere (A₂: 4 kDa) für die Bindung an die B-Untereinheiten zuständig ist. Weiterhin existieren fünf B-Untereinheiten (jede mit 7,7 kDa), die für die Bindung an die Zielzellen verantwortlich sind. Die Hauptrezeptoren für die Verotoxine sind die Globotriosylceramid (Gb₃)-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen befinden (NATARO und KAPER, 1998). Dabei sind Organe wie die Nieren, das Pankreas und das zentrale Nervensystem besonders mit diesen Rezeptoren ausgestattet. Ausnahme ist das VT2e, das Globotetraosylceramid (Gb₄) als Rezeptor benutzt.

Grundsätzlich wird zwischen **VT1**, **VT2** und **Varianten** dieser Toxintypen unterschieden, die einzeln oder auch gleichzeitig bei einem Bakterienstamm nachgewiesen werden können. Die VT2-Varianten (**VT2c**, **VT2d**, **VT2e** und **VT2f**) sind bereits vielfältig untersucht und beschrieben worden. VT1 und VT2 werden

überwiegend durch temperente Bakteriophagen kodiert, mit denen VTEC-Stämme lysogen sind. YEE et al. (1993) konnten bei einem Isolat von einem Kind mit Durchfall zeigen, dass das Gen einer VT2-Variante (VT2va) auf dem Chromosom lokalisiert liegt.

VT1 und VT2 rufen zytopathische Effekte bei einer Reihe von Zelllinien, wie z. B. Vero-, HeLa- (Zervixkarzinom-Zellen von einer Frau [Henriette Lax]), Daudi- (menschliche Burkitt B Lymphom-Zellen) und Leberzellen des Menschen hervor. Resistent gegenüber diesen Toxinen sind beispielsweise Henle 407-Zellen (menschliche Embryonalzellen des Dünndarmes). VT2 ist *in vitro* toxischer für humane renale Endothelzellen als VT1; im Verozelltest hingegen sind keine Unterschiede hinsichtlich der Toxizität zu beobachten. Die Letalität von verschiedenen Labortieren bzw. die Toxinwirkung auf Labortiere wurde von mehreren Arbeitsgruppen ausführlich untersucht. Für Mäuse liegt die Letalität zwischen 100 ng bis 2 µg (O'BRIEN et al., 1983).

VT2-Varianten sind zu über 90 % homolog mit VT2. Inzwischen wurden mehrere, verschiedene VT2-Varianten beim Menschen nachgewiesen, wie das **VT2d**, deren Cluster VT2d-Ount, VT2d-OX3 und VT2d-O111 einschließt. VT2d scheint nach bisheriger Kenntnis weniger toxisch zu sein (PIÉRARD et al., 1998). BEUTIN et al. (2000) beschrieben *E. coli* O118:H16-Stämme, die nur das VT2d Gen besaßen und nicht in Verbindung mit einer Diarrhöe oder gar dem HUS standen. Andererseits zeigten WIELER et al. (2000), dass *E. coli* O118, die auch nur das VT2d Gen besaßen, bei klinischen Erkrankungen wie Diarrhöe und HC in Erscheinung treten können. RAMACHANDRAN et al. (2001) konnte VT2d-Ount, -OX3 und -O111 von non-O157 VTEC aus Kot von gesunden Kälber nachweisen. Sie zeigten, dass VTEC-Isolate von Serotypen, die häufig aus Kälberkot isoliert wurden, auch im Stuhl von symptomlosen Ausscheidern und erkrankten Menschen gefunden werden konnten, wobei diese Isolate einen der VT2d-Subtypen besaßen.

In ihren Untersuchungen konnten TEEL et al. (2002) demonstrieren, dass die Expression von einem VT2d-Subtyp in *E. coli* O91:H21 mit Bakteriophagen assoziiert ist. Andere VT2d-Subtypen des gleichen Stammes waren unabhängig von der Phageninduktion.

ITO et al. beschrieben bereits 1990 eine VT2-Variante bei einem *E. coli*-Stamm humanen Ursprungs vom Serotyp O91:H21. Als Akronym findet man in der Literatur verschiedene Bezeichnungen wie beispielsweise VT2vh (variant human) oder **VT2c**.

Die erste bekannt gewordene VT2-Variante - VT2vp (variant porcine) oder **VT2e** genannt - wurde 1932 beim Schwein nachgewiesen bzw. beschrieben. Dieses Toxin wird vom Erreger der Ödemkrankheit der Absetzferkel gebildet (MARQUES et al., 1987). Diese Variante bindet überwiegend an einen Globotetraosylceramid (Gb₄)-Rezeptor (SAMUEL et., 1990; DEGRANDIS et al., 1989) und spielt bei klinischen Erkrankungen des Menschen nur eine untergeordnete Rolle. Die VT2-Variante VT2e wird hingegen wie das Shiga-Toxin chromosomal kodiert. MUNIESA et al. (2000) konnten jedoch VT2e-Bakteriophagen in einem VTEC-Stuhlisolat, das Diarrhöe verursachte, lokalisieren.

Kürzlich haben SCHMIDT et al. (2000) eine neue VT2-Variante -**VT2f** genannt- in Taubenkot nachgewiesen. In einer Arbeit wurde gezeigt, dass VT2f-positive VTEC-Taubenkot-Isolate häufig den Serogruppen O45, O18ab und O75 angehören und weitere Virulenz-Faktoren besitzen können, wie Intimin und CLDT (Cytolethal distending toxin). Die Tauben werden als natürliches Reservoir von VT2f-positiven VTEC angesehen (MORABITO et al., 2001).

Es gibt auch **VT1-Varianten**, die bisher nicht sehr bekannt sind. ZHANG et al. (2002) haben eine neue VT1-Variante -**VT1c** genannt- in Stuhl nachgewiesen. Diese Variante war identisch zu einer VT1-Variante, die aus Schaffäzes isoliert wurde, und zeigt 97,1 % bzw. 96,6 % Ähnlichkeit in der A- bzw. B-Untereinheit zu dem von Bakteriophagen 933J kodierten VT1. Neuerdings wurde erstmals in einem Isolat boviner Herkunft (Stamm A29; O n.t.:H19) eine VT1-Variante isoliert, die in ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz wesentlich stärker vom Prototyp aus Phage 933J abweicht als alle bisher beschriebenen VT1-Varianten. Kulturüberstände von *E. coli* A29 erwiesen sich als zytotoxisch gegenüber Verozellen (BÜRK et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, besteht eine sehr große Homologie zwischen dem Verotoxin und dem Shigellentoxin. VT1, VT2 und Shiga-Toxin zeigen die gleiche Toxizität gegenüber bestimmten Zelllinien. VT1 und Shiga-Toxin werden durch den gleichen

Antikörper, d. h. kreuzweise, neutralisiert (STROCKBINE et al., 1985). VT2 hingegen lässt sich nicht mit einem VT1-Antitoxin neutralisieren und unterscheidet sich auch in seiner Struktur, der biologischen Aktivität auf Zellkulturen und im Tierversuch von VT1 (SCOTLAND et al., 1985; STROCKBINE et al., 1986; KARMALI, 1989). Die prototypischen VT1- und VT2-Toxine zeigen 55 und 57 % Sequenz-Identität in der A- und B-Untereinheit (JACKSON et al., 1987). Die A-Untereinheit von VT2 ist größer als die von VT1; die LD₅₀ für Kaninchen ist bei VT2 100fach größer. VT2 zeigt nur 60 % DNA-Homologie zum Shiga-Toxin. Während VT1 und VT2 sowohl toxisch gegenüber Vero- als auch HeLa-Zellen sind, zeigen die VT2-Varianten keine zytotoxische Wirkung auf HeLa-Zellen. Diese Varianten sind nur mit einem Antiserum gegen VT2 zu neutralisieren. Unterschiede zwischen VT2 und den VT2-Varianten sind in der biologischen Aktivität, in der serologischen Reaktion und in der Rezeptorbindung zu finden. Die A-Untereinheit von VT2e ist beispielsweise nahezu identisch zur A-Untereinheit von VT2 (94 % Basenhomologie); die B-Untereinheit nur zu 55 % (KARCH und BOCKEMÜHL, 1989).

Der Transport des Toxins durch die Darmwand hindurch ist transzellulär; energieabhängig und directional (von apikal nach basal). Andere Autoren behaupten, dass dieser VT-Transport auch parazellulär erfolgen kann. Das Toxin gelangt vorwiegend über die Blutbahn zu den Zielzellen. Die Wirkung des Toxins besteht vor allem in der Störung der Proteinbiosynthese durch enzymatische Inaktivierung der Ribonukleinsäure an den 60 S-Ribosomen von Zellen, die letztendlich zum Zelltod führt. Das Toxin wirkt lokal, d. h. auf den Darm, aber auch systemisch. Die gastrointestinale Schädigung wird auch durch systemische Toxine verursacht (PATON und PATON, 1998). Die Zerstörung von Endothelien führt zu Resorptionsstörungen und damit Störungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Durch die Schädigung kleinerer Blutgefäße kommt es zu einer Mikrothrombenbildung. Gerade die Mikrothromben können zu Ausfallserscheinungen bei Organen wie Gehirn, Darm und Nieren führen. Im Blutaussstrich wird als Ausdruck der Hämolyse eine typische Fragmentation der Erythrozyten beobachtet (BITZAN und KARCH, 1992). Neben diesem zytotoxischen Weg wird eine Apoptose beschrieben, die durch Einwirkung auf B-Lymphozyten auch zu einer Immunschwäche des Patienten führen kann.

2.2.1.3 Einflüsse auf die Verotoxinbildung

Die Toxinbildung einer Zelle unterliegt einer Reihe von unterschiedlichen Einflüssen. Beispielsweise wird bei einem mit dem Phagen 933J lysogenisierten *E. coli* die Synthese von VT1 bei hohen Eisenkonzentrationen unterdrückt (WEINSTEIN et al., 1988).

Die VT2-Produktion wird scheinbar durch zwei Mechanismen beeinflusst: Erstens durch eine Phagenvermehrung und damit einer Vervielfältigung von Kopien der Toxingene, und zweitens über einen Phagen-kodierten Faktor, der einen positiven regulatorischen Einfluss auf das VT2-Operon hat (MÜHLDORFER et al, 1996).

Die Toxinproduktion kann über eine Phageninduktion, die z. B durch das Antibiotikum Mitomycin oder durch UV-Bestrahlung ausgelöst werden kann, gesteigert werden (ACHESON und DONOHUE-ROLFE, 1989; AL-JUMAILI et al., 1992).

KARCH et al. (1985) konnten zeigen, dass die Zugabe verschiedener Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen zu Anreicherungen eines *E. coli* O157:H7-Stammes unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Toxinmenge zeigten. Zellen, die Ciprofloxacin, Lincomycin oder Gentamycin ausgesetzt waren, produzierten weniger Toxin im Vergleich zum Kontrollansatz. Die Störung der Proteinbiosynthese führte zur Abnahme der Toxinsynthese. Bei Zugabe von Sulfamethoxazol, Trimethoprim oder Cotrimoxazol wurden höhere Toxinkonzentrationen gemessen. Als Ursache hierfür diskutierten KARCH und Mitarbeiter nicht eine Phageninduktion, sondern eine durch bestimmte Antibiotika ausgelöste Änderung der Zusammensetzung der Außenmembran der Zelle. Die dadurch veränderte Zellpermeabilität führte zu einer Freisetzung von Toxin.

Dieses Phänomen vermuteten KARMALI et al. (1985) ebenso bei einer Behandlung von VTEC mit Polymyxin B. Durch die Abnahme der Toxinmenge in der Zelle kann es dann nachfolgend über einen "feed-back"-Kontrollmechanismus zu einer verstärkten Toxinproduktion kommen.

Eine weitere Studie von PETRIC et al. (1987) konnte zeigen, dass Cycloheximid die Sensibilität von Verozellen gegen VT erhöht. Puromycin bewirkt das Gegenteil.

Neben Antibiotika und anderen Stoffen gibt es weitere biologische Einflüsse bzw. Unterschiede, wie z. B die Temperatureinwirkung. VT1 ist hitzestabil bei 45-70 °C für bis zu 60 min, wird aber bei 80 °C innerhalb von 60 min und bei 85 °C innerhalb von 5 min inaktiviert (SOFOS und SMITH, 1993).

2.2.1.4 Weitere Charakterisierung der VTEC

Als ein weiterer putativer Virulenzfaktor, der häufig bei VTEC vertreten ist, wird das EHEC-Hämolysin-Gen (*hly*-Gen) angesehen. Kodiert wird das Gen über ein 60 MDa Plasmid, das sogenannte pO157 Plasmid, auf dem sich weitere bereits bekannte Gene befinden. Enterohämolysin ist ein Poren-bildendes Zytolysin, das zur RTX („repeats-in-toxins“-Familie der Exoproteine zählt und zu Permeabilitätsstörungen in eukaryotischen Zellen und damit zur Lysis führt. Enterohämolysin ist überwiegend zellgebunden. Es ist weder genetisch noch serologisch eng verwandt mit dem α -Hämolysin (BEUTIN et al., 1989). Es besteht nur eine 70 %ige DNA-Sequenzhomologie zum Gen, das für das α -Hämolysin kodiert. Die Bedeutung bzw. Wirkungsweise des Enterohämolysins bei der Pathogenese des Infektionsgeschehens ist allerdings noch nicht genau bekannt.

Die serologische Vielfalt der VTEC ist groß. Über 300 verschiedene Serotypen (O:H bzw. O:H) sind bisher bekannt (BÜLTE, 2002). So können Vertreter einer O-Gruppe verschiedene Pathogruppen wie EPEC, ETEC oder EHEC, aber auch apathogene Stämme enthalten. Die alleinige Bestimmung des Serotyps lässt in der Regel keine endgültige Aussage über die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe zu.

Durch horizontalen Gentransfer *inter* und *intra speciem* können VTEC ihr Virulenzspektrum erweitern, aber auch Virulenzfaktoren z. B. durch Phagen übertragen. SCHMIDT et al. (1993) konnten einen Verotoxin-bildenden *Citrobacter freundii*-Stamm, der mit VT2-Sonden hybridisierte, in Stuhl von Patienten mit Durchfall und gleichzeitig in Rindfleisch nachweisen. Hier wurde ein horizontaler Gentransfer von VTEC auf *Citrobacter freundii* vermutet. In einem ähnlichen Fall

konnten Verotoxin 2-bildende *Enterobacter cloacae* bei einer HUS-Erkrankung nachgewiesen werden (PATON und PATON, 1996). In einer Untersuchung von YARON et al. (2000) wurde demonstriert, dass Membranvesikel, die von einem *E. coli* O157:H7-Stamm isoliert wurden, den Gentransfer *inter* und *intra speciem* erleichtern können.

2.2.2 Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

2.2.2.1 Ursprung und Definition

Die Etablierung von EHEC als eigenständige *E. coli*-Pathogruppe erfolgte nach zwei epidemiologischen Beobachtungen. Die erste wurde von RILEY et al. (1983) beschrieben, der einen Ausbruch von *E. coli* O157:H7 in Verbindung mit hämorrhagischer Colitis nach dem Verzehr von Hamburgern untersucht hat. Die zweite Feststellung stammt von KARMALI et al. (1983), der die Verbindung zwischen dem Hämolytisch-urämischem Syndrom und fäkalem Cytotoxin bzw. cytotoxischen *E. coli* im Stuhl beschrieben hat.

TZIPORI et al. (1987) definieren EHEC als *E. coli*, die im Zusammenhang mit einer HC isoliert worden sind, mindestens ein Verotoxin produzieren, ein großes Plasmid (60 MDa) besitzen und typische Läsionen in Darmmukosazellen von gnotobiotischen Schweinen verursachen.

BOCKEMÜHL und KARCH (1996) bezeichnen als EHEC alle *E. coli*, die beim Menschen unter Bildung von Zytotoxinen zu klinischen Erkrankungen und nicht nur zur Auslösung einer hämorrhagischen Colitis und eines HUS befähigt sind. Im übrigen sind sie der Meinung, dass dieses prinzipiell für alle VTEC zutrifft, so dass sie grundsätzlich sämtliche verotoxinogenen *E. coli* als EHEC bezeichnen. Diese Interpretation hat auch Eingang in das neue Bundesinfektionsschutzgesetz (ANON., 2000) gefunden.

2.2.2.2 Virulenzfaktoren

Als Untergruppe der VTEC besitzen EHEC die genetische Voraussetzung, um Verotoxin produzieren zu können. Bei Betrachtung des Vorkommens bzw. der Verteilung verschiedener Toxintypen im Zusammenhang mit EHEC-Erkrankungsfällen stellten BOCKEMÜHL et al. (1997) fest, dass HUS-Fälle häufiger mit VT2 assoziiert waren, während bei einfachen Enteritiden häufiger VT1-Bildner nachzuweisen waren. Es konnte in dieser Studie bei der Serogruppe O157 überwiegend VT2 nachgewiesen werden. Somit bestätigt sich die bereits früher im Tierversuch aufgestellte Hypothese, dass VT2 toxischer als VT1 ist. Dieses konnten auch THOMAS et al. (1996) belegen.

Neben der Verotoxinbildung besitzen EHEC regelmäßig noch weitere Virulenzfaktoren wie das bereits bei den VTEC genannte EHEC-Hämolsin-Gen (*hly*-Gen) (SCHMIDT et al., 1995), zumeist ein *eae* („*E. coli* attaching and effacing“)-Gen (GALLIEN et al., 2000) und das *Katp* (Katalase-Peroxidase)-Gen (BRUNDER et al., 1996). Allerdings diskutiert O'LOUGHIN (1997), ob zumindest bei der Entwicklung einer Colitis andere Virulenzfaktoren beteiligt sind, da im Tierversuch bereits *E. coli* O157:H7 nachgewiesen werden konnten, die kein Verotoxin produzierten. Ebenso gibt es EHEC, die von HUS-Patienten isoliert worden sind, die das *eae*-Gen nicht besitzen (BONNET et al., 1998). Hier werden andere, noch nicht bekannte Adhärenzfaktoren als Virulenzfaktoren vermutet. Neuerdings haben BRUNDER et al. (2001) ein 32 kb Fragment vom Plasmid eines Sorbit-fermentierenden EHEC O157:H (pSFO157) näher charakterisiert, das sich vom pO157 der klassischen Sorbit-negativen EHEC O157:H7 unterscheidet. Dieses Fragment beinhaltete das Gen-Cluster *sfp*, das für die Kodierung einer neuartigen Fimbrienart verantwortlich ist. Die meisten Isolate von Patienten mit HC und HUS produzieren jedoch Intimin, d. h. sind *eae*-positiv, und reagieren mit der pCVD419-Gensonde, die aus dem hochkonservierten Plasmid **pO157** entwickelt worden ist (NATARO und KAPER, 1998).

Das ursprünglich bei *E. coli* O157:H7 gefundene und danach benannte große Plasmid pO157 beherbergt das bereits erwähnte **EHEC-Hämolsin-Gen** (EHEC-*hlyA* oder *ehxA*), das für die Kodierung des EHEC-Hämolsins zuständig ist, und seine assoziierten Sequenzen (EHEC-*hlyC*, EHEC-*hlyB* und EHEC-*hlyD*), die für die

Aktivierung und Sekretion dieses Proteins zuständig sind. Experimente haben gezeigt, dass der enterohämolytische Phänotyp des EHEC-Hämolysins in Beziehung mit einem defektiven Hämolysin-Sekretions-System steht. Ebenfalls konnte bei diesem Experiment demonstriert werden, dass die ca. 3,4 kb große pCVD419-Gensonde Teile dieser Gene (*hlyA* und 5' Region von *hlyB*) enthält (SCHMIDT et al., 1995). Die Größe des gesamten Plasmids variiert zwischen ca. 93,6 kb und 107 kb (SCHMIDT et al., 1996). Das *hly*-Gen von O157:H7-Stämmen (EDL 933) ist beispielsweise zu 99,4 % identisch zu EHEC O111-Stämmen (SCHMIDT und KARCH, 1996). Dieses Gen ist hochkonserviert und variiert bei den verschiedenen VTEC-Serotypen zu unter 4 % in seiner Struktur (BOERLIN et al., 1998). Nach Untersuchungen von SCHMIDT und KARCH (1996) sind O111-Isolate von HUS-Patienten im Gegensatz zu Isolaten von Diarrhöe-Patienten signifikant häufiger EHEC-Hämolysin-positiv. Eine größere Anzahl an EHEC jedoch besitzen weder geno- noch phänotypisch diese Hämolyseseigenschaften.

Das *katp*-Gen, das auf dem pO157-Plasmid zu finden ist, kodiert eine bifunktionelle Katalase-Peroxidase, die zusätzlich zu anderen bei der Spezies *E. coli* vorkommenden Katalasetypen nachgewiesen wird (BRUNDER et al., 1996). Über dieses große Plasmid werden auch eine *E. coli*-Serinprotease (extrazelluläre Serinprotease-Gen: *espP*-Gen) und ein Typ II-Sekretionssystem („EHEC type II secretion pathway“: *etp*-Gen) kodiert. Die Serinprotease spaltet vom Schwein stammendes Pepsin A und den humanen Gerinnungsfaktor V (BRUNDER et al., 1997).

Die Bedeutung des pO157-Plasmids im Infektionsgeschehen ist noch nicht endgültig geklärt, zumal dieses Plasmid bei klassischen Serotypen wie O157:H7 bzw. O26:H11 von humanen Isolaten (meist von Nord-Amerika) zu etwa 99 bzw. 77 % vorkommt, bei anderen VTEC-Stämmen zu etwa 81 % nachgewiesen wird (LEVINE et al., 1987). Eine nachfolgende Untersuchung mit europäischen Stämmen hat gezeigt, dass dieses Plasmid auch bei 60 % der VT-positiven Isolate von anderen Serotypen als O157:H7 und O26:H11 vorkommt (WILLSHAW et al., 1992). Im Gegensatz zu der hohen Frequenz von Plasmiden in humanen Isolaten besitzt nur eine Minderheit der non-O157:H7-Isolate von Rindern dieses Plasmid (BARRETT et al., 1992).

Die Virulenz wird neben Plasmiden auch von chromosomalen Genen bestimmt, die überwiegend auf einer sogenannten Pathogenitätsinsel organisiert sind. Der **LEE**-Lokus („Locus of Enterocyte Effacement“) der EHEC ist ca. 42,5 kb groß und beherbergt unter anderem das *eae*-Gen, welches ein 94-97 kDa großes Protein (Intimin) kodiert. Neben EHEC besitzen EPEC ebenso einen ca. 35 kb großen LEE-Lokus und damit die Fähigkeit, AE-Läsionen in der Darmmukosa zu verursachen (NATARO und KAPER, 1998; GALLIEN et al., 2000). Die *eae*-Gene von EHEC und EPEC sind nur zu etwa 80 % identisch, so dass sie mit universellen Primern gleichzeitig erfasst oder mit spezifischen Primern unterschieden werden können (SCHMIDT et al., 1994). Während das A-Ende eine Homologie der Aminosäuresequenz von über 90 % aufweist, ist am C-Ende dieses Proteins eine deutlich niedrigere Homologie zu beobachten (AGIN und WOLF, 1997). Diese Unterschiede können zur Feststellung von „Verwandtschaftsgraden“ von *E. coli*-Stämmen aus verschiedenen pathogenen *E. coli*-Gruppen oder innerhalb einer Gruppe herangezogen werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass das *eae*-Gen subtypisiert werden kann in: α -*eae*, β -*eae*, γ -*eae*, δ -*eae* und ε -*eae* (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000). In einer Arbeit von GALLIEN et al. (2000) konnte festgestellt werden, dass das γ -*eae* hauptsächlich in Isolaten der Serotypen O157:H7 und O157:H⁻ auftrat. Außerdem wurde es in Stämmen der Serogruppe O145 und in einem Isolat der Serogruppe O111 detektiert. β -*eae* trat in Isolaten der Serogruppen O26, O118 und O5 auf.

Neben dem *eae*-Gen sind auf dem LEE-Lokus noch ein *esps*-Gen („E. coli secreted proteins“), ein *tir*-Gen („translocated intimin receptor“), das einen Intimin-Rezeptor kodiert, und ein Typ III-Sekretionssystem, das für die Sekretion und Translokation der Esp-Proteine verantwortlich ist, lokalisiert (PATON und PATON, 1998).

Neuerdings wurde ein sogenanntes *pas*-Gen („Protein associated with secretion“) entdeckt, das zwischen den *eaeA*- und *espA*-Genen lokalisiert ist. Dieses Genprodukt ist essentiell für die Sekretion von Esp-Proteinen (KRESSE et al., 1998).

Extrachromosomale Virulenzgene, wie z. B. *vtx*-Gene, können wie bei den VTEC spontan oder durch Subkultivierung verloren gehen (KARCH et al., 1992; FENG et al., 2001) bzw. weitergegeben werden (SCHMIDT et al., 1993). EHEC besitzen damit eine hohe Anpassungsfähigkeit (BOCKEMÜHL und KARCH, 1996).

Weiterhin kommt bei den EHEC neben dem Verotoxin ein hitzestabiles Enterotoxin (EAST1: „EAEC heat stable enterotoxin 1“) vor, das chromosomal kodiert wird (*astA*-Gen) und auch bei den EAEC nachzuweisen ist (SAVARINO et al., 1996).

2.2.2.3 Serotypenvielfalt

Neben dem Prototypen der EHEC *E. coli* O157:H7 sind weitere EHEC-Serotypen wie O26:H11/H⁻ (ANON., 2001b; WHITTAM et al., 1993), O111:H⁻ (SCHMIDT und KARCH, 1996) und O103:H2 weltweit verbreitet. Man bezeichnet sie auch als klassische EHEC. Die Dominanz bestimmter Serogruppen bzw. Serotypen bei EHEC-Infektionen kann sich aber im Laufe der Zeit ändern. Der Serotyp O103:H2 ist ursprünglich mit Durchfallerkrankungen beim jungen Kaninchen assoziiert (BLANCO et al., 1994). Stämme vom Menschen und Kaninchen sind eng verwandt, aber an ihre Wirte adaptiert. Die Arbeitsgruppe von MARIANI-KURKDJIAN (1993) konnte die Hypothese einer Übertragung zwischen Kaninchen und Mensch widerlegen.

2.2.2.4 Tenazität

In der Literatur sind Einflüsse unterschiedlicher Natur auf *E. coli* O157:H7 ausführlich beschrieben worden. Wenige Studien haben sich aber mit non-O157-EHEC beschäftigt.

Die meisten EHEC-Stämme wachsen zwischen 10 °C und 45 °C (PALUMBO et al, 1995). Verotoxin wird bereits bei einer Temperatur von 10 °C produziert. Je höher die Temperatur liegt, um so mehr Toxin wird gebildet.

EHEC zeigen eine ausgeprägte Säuretoleranz. Es ist nicht genau geklärt, inwiefern sie konstitutiv oder induzierbar ist. Diese Säuretoleranz zeigt sich durch Überleben in Lebensmitteln wie Mayonnaise (pH 4,0) oder Apfelcidre (pH 3,5-4,0) und durch das scheinbar problemlose Überwinden der Magenpassage bei einem pH von 2,5 (BENJAMIN und DATTA, 1995). Dieses erklärt vermutlich auch die sehr niedrige *dosis infectiosa minima* dieser Erreger. Untersuchungen von DIEZ-GONZALEZ et al. (1998) konnten zeigen, dass *E. coli*-Stämme aus der Pansen-/Darmflora vom Rind in Abhängigkeit der Fütterung eine unterschiedliche Ausprägung der Säureresistenz

entwickelten. So war diese bei Fütterung mit Getreide 10^6 -fach größer als nach Gabe von Heu. Ebenso war der quantitative *E. coli*-Gehalt höher.

Alle EHEC sind gegen Desinfektionsmittel, die auf gramnegative Bakterien wirken, empfindlich.

2.2.2.5 *E. coli*-Serotypen O157:H7 und O157:H⁻

Der *E. coli*-Serotyp O157:H7 ist der am häufigsten verbreitete und untersuchte Vertreter der Gruppe der EHEC. Im Gegensatz zu etwa 95 % aller anderen *E. coli*-Stämme fermentiert dieser Serotyp innerhalb von 24 h kein Sorbit (FARMER und DAVIS, 1985) und produziert nicht das Enzym β -D-Glucuronidase (THOMPSON et al., 1990). Man spricht dann von typischen oder klassischen *E. coli* O157, wie der Serotyp O157:H7. H⁻-Varianten hingegen sind zu ca. 50 % Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiv. Sie sind in ihrer Pathogenität ebenso wie die klassischen *E. coli* O157 einzuschätzen. In einer Studie von GUNZER et al. (1992) wurden 792 klinische Stuhlproben (HUS-Fälle oder Diarrhöen) auf *E. coli* O157 untersucht. Insgesamt wurden 44 O157:H7- und O157:H⁻-Stämme identifiziert. 17 Stämme (38,6 %) waren Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiv. Dabei handelte es sich ausschließlich um H⁻-Stämme. ALEKSIC et al. (1992) konnten in einer ähnlichen Studie 25,6 % Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positive *E. coli* O157 isolieren. Darunter befand sich nur ein einziger *E. coli* O157:H7-Stamm.

2.2.2.5.1 Evolution und Virulenzprofil

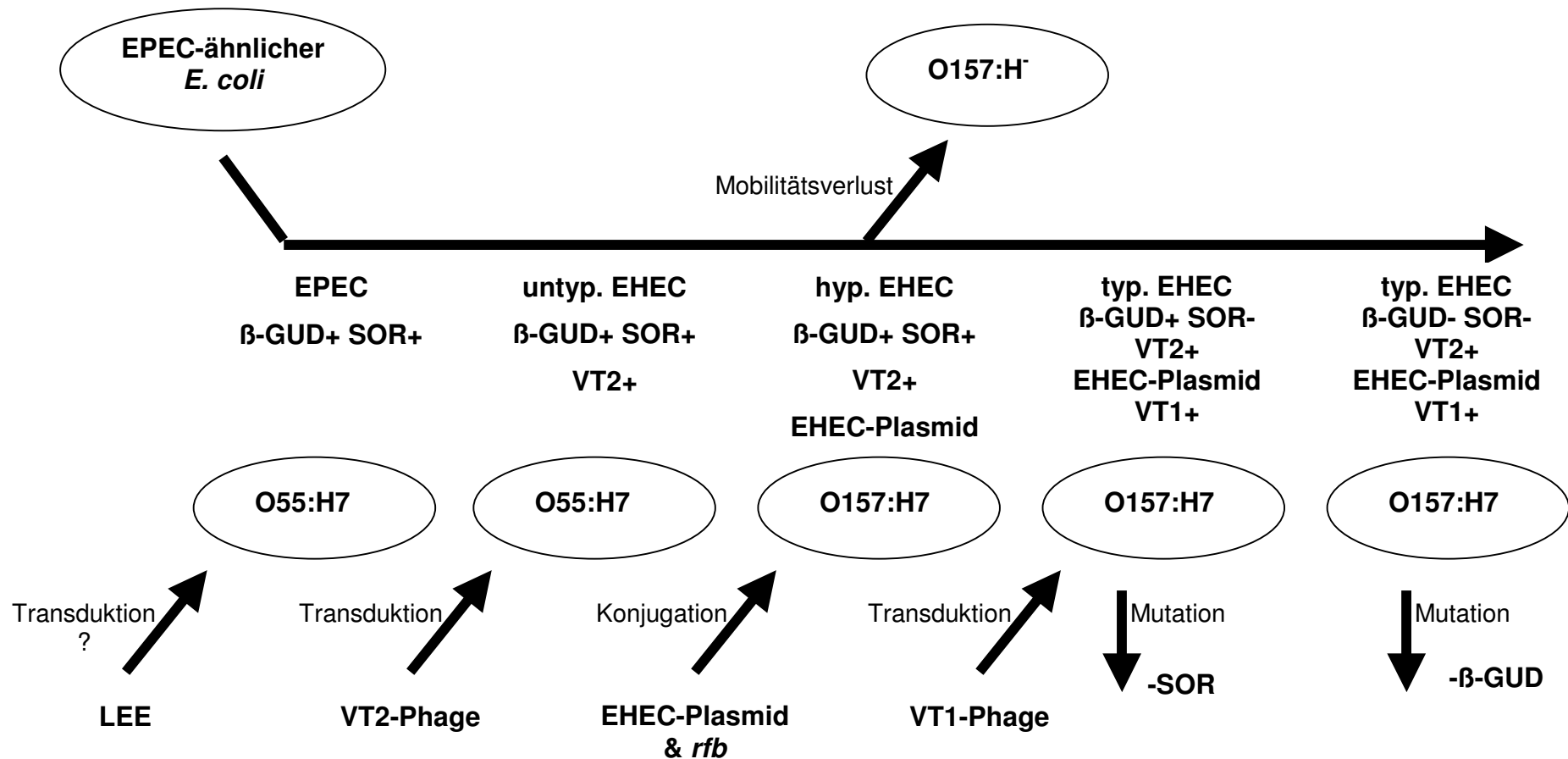
1982 wurde nach zwei größeren Erkrankungsserien dieser neue *E. coli*-Serotyp bekannt. Es wurde von einem „new and emerging bacterial pathogen“ gesprochen (GRIFFIN und TAUXE, 1991). Mehrere Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen konnten beweisen, dass sich die Inzidenz an O157:H7-Erkrankungen bei Kindern seit Anfang der 70er bis Ende der 80er Jahre in den USA vervielfacht hatte (PADHYE und DOYLE, 1992). Neben H7-Stämmen werden auch H⁻-Stämme isoliert. Nach einer Untersuchung von FENG et al. (1996) ist allerdings davon auszugehen, dass einige Stämme aufgrund unterschiedlicher Einflüsse falsch typisiert wurden und sich bei weitergehender Untersuchung doch als beweglich bzw. als *E. coli* O157:H7

erwiesen. Durch Feintypisierung konnte gezeigt werden, dass diese vermeintlichen *E. coli* O157:H⁻ genetisch der Gruppe der *E. coli* O157:H7 zuzuordnen waren.

E. coli O157:H7 ist scheinbar aus einem einzigen Klon-Komplex entstanden, der keine engere Verwandtschaft zu VTEC-Stämmen anderer Serotypen zeigt. (WHITTAM et al., 1988; BÖHM und KARCH, 1992). Später hatten WHITTAM et al. (1993) in zahlreichen Multilokus-Enzymelektrophorese-Untersuchungen gezeigt, dass der O157:H7-Klon als Verursacher der HC und des HUS genetisch mit einem EPEC-Stamm des Serotyps O55:H7 näher verwandt ist als mit anderen O157-Stämmen, die von durchfallkranken Tieren isoliert wurden. Dieser O55:H7-Klon ist mit Durchfall bei Kleinkindern assoziiert und produziert kein Verotoxin. Die enge klonale Verwandtschaft wird ebenso dadurch belegt, dass das C-Ende des Intimins vom EPEC-Stamm O55:H7 zu 98 % mit dem des EHEC-Stammes O157:H7 übereinstimmt (LOUIE et al., 1994). WHITTAM et al. (1993) bzw. WHITTAM (1998) favorisieren die These einer mehrstufigen Entstehungsgeschichte des O157:H7-Klons. Ausgegangen wird von einem EPEC-ähnlichen Vorläuferstamm, von dem der O55:H7-Klon abstammt und bei dem die Pathogenitätsinsel LEE in *se/C* inseriert ist. Der zweite Schritt ist charakterisiert durch die Transduktion mit einem Toxin-konvertierenden Bakteriophagen und resultiert in der Entwicklung eines Verotoxin-2-produzierenden O55:H7-Stammes. Durch Genaustausch von O55 zu O157 entsteht ein hypothetischer VT2-produzierender O157:H7-Vorläufer, der zusätzlich vermutlich ein EHEC-Plasmid trägt (TARR et al., 1999). BILGE et al. (1996) vermuten, dass der Übergang vom O55- zum O157-Antigen Ergebnis von lateralem Transfer und Rekombination einer *rfb*-Region ist, die für ein *rfbE*-Gen kodiert, das einer Perosamin-Synthetase von *Vibrio cholerae* homolog ist. Aus diesem O157:H7-Vorläufer entstanden zum einen durch Mobilitätsverlust der O157:NM-Klon und zum anderen vermutlich durch Phagen-Konversion der nun VT1- und VT2-produzierende O157:H7 Klon. In weiteren Stufen bzw. Schritten wurde das Vermögen der Sorbit-Fermentierung (SOR) und die β -D-Glucuronidase-Aktivität (β -GUD) verloren. Dieser Klon streute dann weltweit (WHITTAM, 1998). Nach Aussage von KARCH et al. (1993) stellen die Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiven *E. coli* O157:H⁻-Vertreter eine sogenannte Richtungsänderung in dieser sukzessiven Entwicklung dar. Sie besitzen das gleiche Virulenzpotential wie die klassischen, d. h. Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativen *E. coli* O157:H7, scheinen aber letztendlich aus zwei

verschiedenen Klonen entstanden zu sein. FENG et al. (1998) haben mittels Multilocus-Enzymelektrophorese auch demonstriert, dass diese Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiven *E. coli* O157:H⁻-Stämme anderen elektrophoretischen Subtypen zuzuordnen sind als die Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativen *E. coli* O157:H7. Allerdings zeigten bei dieser Untersuchung andere *E. coli* O157:H⁻-Stämme identische Elektrophorese-Ergebnisse wie die klassischen *E. coli* O157:H7. Die Evolutionsschritte des O157:H7-Komplex sind in Abbildung 2-1 aufgezeichnet.

Abbildung 2-1: Stufenweise Entstehung von EHEC O157:H7 (modifiziert nach WHITTAM, 1998)



E. coli O157 lassen sich sowohl in ihren phäno- als auch genotypischen Eigenschaften von anderen Serogruppen abgrenzen. Beim Prototyp der EHEC, dem Serotyp O157:H7, konnten KARCH et al. (1987) eine Adhärenz durch Fimbrien bei Henle-407 Zellen, aber nicht bei HeLa-Zellen beobachten. Die Fimbrien werden über das 60 MDa-Plasmid kodiert. Spätere Studien zeigten, dass Fimbrien alleine nicht für eine Adhärenz verantwortlich sind, sondern dass andere Strukturen auf der Außenmembran der Erreger eine Rolle spielen müssen (PADHYE und DOYLE, 1992).

Neben dem LEE-Lokus besitzen *E. coli* O157-Stämme das bereits erwähnte pO157-Plasmid. Neben dem pO157-Plasmid kommen sporadisch eine Reihe weiterer kleinerer Plasmide vor. HOFINGER et al. (1998) diskutieren eine über ein 6,7 kb-Plasmid (pCOLD157) kodierte Colicin-Produktion als einen weiteren möglichen Virulenzfaktor, zumindest für *E. coli* O157:H7, da dieses Plasmid nach Untersuchungen von KARCH et al. (1993) nicht bei Sorbit-positiven O157:H⁻-Stämmen nachzuweisen ist. Ansonsten besitzen *E. coli* O157:H7 regelmäßig die für EHEC typischen Virulenzfaktoren (siehe Abschnitt 2.2.2.2).

2.2.2.5.2 Tenazität

Temperatur:

Mit den in der Lebensmittelmikrobiologie üblichen Standardnachweismethoden für *E. coli* werden O157:H7-Stämme regelmäßig nicht entdeckt, da manche Stämme oberhalb einer Temperatur von 41 °C nicht oder nur schlecht wachsen (DOYLE und SCHOENI, 1984; PALUMBO et al., 1995; RAGHUBEER und MATCHES, 1990). In Deutschland sieht die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (§ 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz [LMBG]) beispielsweise für den Nachweis von *E. coli* aus Fleisch und Fleischerzeugnissen eine Inkubationstemperatur der Nährmedien von 44 °C vor, in den USA („US Foods and Drug Administration“) werden zum Nachweis von Coliformen in Wasser und Lebensmitteln 44-44,5 °C vorgesehen. PALUMBO et al. (1995) hingegen konnten bei Untersuchungen verschiedener O157:H7-Stämme (n = 23) bei 78 % der Stämme feststellen, dass diese auch noch bei Temperaturen von 45 °C ein Wachstum

zeigten. FERENC et al. (2000) konnte auch das Wachstum von *E. coli* O157:H7 bei 45,5 °C in EC-Bouillon nachweisen.

Die Generationszeit für *E. coli* O157:H7 in Trypton-Soja-Bouillon liegt bei ca. 30 min bei 37 °C und bei ca. 38 min bei 42 °C (DOYLE und SCHOENI, 1984). Ein Wachstum findet wie bei den anderen EHEC-Serogruppen ab 10 °C statt (PALUMBO et al, 1995). Der D-Wert von *E. coli* O157 in Hackfleisch wurde bei einer Temperatur von 64,3 °C zu 9,6 s bestimmt und zeigt somit keine ungewöhnliche Hitzeresistenz (DOYLE und SCHOENI, 1984). *E. coli* O157:H7 wachsen in Trypton-Soja-Bouillon nur, wenn der NaCl-Gehalt bei $\leq 6,5$ % liegt (GLASS et al., 1992).

E. coli O157:H7 überleben eine Lagerung von Lebensmitteln bei 4 °C und auch bei Gefriertemperatur von -20 °C für neun Monate, mit einer anfänglichen Behandlung bei -80 °C für 30 min (DOYLE und SCHOENI, 1984). Untersuchungen von SEMANCHEK und GOLDEN (1998) konnten zwar belegen, dass bei einer Lagerung von *E. coli* O157:H7-Stämmen bei -20 °C über einen Zeitraum von bis zu sieben Monaten ein großer Teil (4 bis 6 log-Stufen) der Population abstirbt, aber dennoch eine nachweisbare Anzahl an Keimen überlebt. Die Überlebensrate ist nach Untersuchungen von SAGE und INGHAM (1998) zudem abhängig von der Art des Auftauens von Apfel-Cidre (im Kühlschrank, bei Raumtemperatur oder in der Mikrowelle), aber auch von den Stämmen selbst.

In Mayonnaise sterben die Erreger am schnellsten bei Temperaturen von 20 bis 30 °C - wie sie für die Lagerung von Konserven beim Hersteller oder im Laden kennzeichnend sind - ab. Länger überleben können *E. coli* O157:H7 in Mayonnaise oder Mayonnaise–Dressing, wenn sie im Kühlschrank bei etwa 5 °C gelagert werden. Nach Untersuchungen von HATHCOX et al. (1995) konnten bei Lagerung der Mayonnaise, die mit 6,23 log₁₀ KbE/g inokuliert war, bei 30 °C nach 4 Tagen keine *E. coli* O157:H7 mehr nachgewiesen werden; bei Lagerung bei 5 °C waren diese noch bis zu 93 Tagen nachweisbar.

Die Lagerungstemperatur von Rohwürsten hat ähnliche Einflüsse auf die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O157:H7. FAITH et al. (1997) konnten feststellen, dass nach 14 Tagen bei 21 °C eine Reduzierung von *E. coli* O157:H7-Teststämmen

je nach Verpackungsart um 2 (Vakuum-Verpackung) bis 4 \log_{10} (Luft-Verpackung) auftrat. Bei Lagerung bei 4 °C wurde nur eine Reduzierung von 1 bis 2 und bei -20 °C von 1,5 \log_{10} erreicht.

Gase:

Die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O157:H7-Stämmen wird auch durch Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von frischen Produkten wie Verpackung in Vakuum oder modifizierter Atmosphäre (Mischungen aus CO₂, O₂ und N₂) nicht beeinflusst (ABDUL-RAOUF et al., 1993a; HAO und BRACKETT, 1993; NG et al., 1997). Sie sind daher als CO₂-tolerant anzusehen (SUTHERLAND et al, 1997).

Wasserstoffperoxyd, das z. B. von Laktobazillen produziert wird, hat einen inhibitorischen Einfluss auf *E. coli* O157:H7. Bei Lebensmitteln wie Geflügel kann bei gleichzeitiger Kühlung zumindest eine Wachstumshemmung nach Zusatz von Laktobazillen, speziell *Lactobacillus lactis*, beobachtet werden (BRASHEARS et al., 1998).

Azidität:

Weiterhin weisen sie sich durch eine Säuretoleranz aus. Die Bakterien überleben niedrige pH-Werte von 2,0 bis 4,0. Sie können in Apfelsauce bei Temperaturen von 8 °C zwei bis vier Wochen (ZHAO et al., 1993) oder in Mayonnaise bei 5 °C mit einer initialen Keimzahl von 6,23 \log_{10} KbE/g bis zu 93 Tage (HATHCOX et al., 1995) überleben. Hinsichtlich des Einflusses des pH-Wertes sind *E. coli* O157 empfindlicher gegen Essigsäure als gegen Milchsäure oder Zitronensäure (ABDUL-RAOULF et al., 1993b). Dabei ist die Milchsäure noch wirksamer als die Zitronensäure.

E. coli O157-Zellen können daher Herstellungs- und Reifungsprozesse von Joghurt oder bestimmten Käsesorten, wie z. B. Feta-, Colby- und Romano-Käse, über einen Zeitraum von fünf oder acht bis 17 Monaten (in Joghurt bei 4 bis 10 °C) bzw. einen Monat (in Käse) überleben (HUDSON et al., 1997).

E. coli O157:H7-Stämme wachsen nach Untersuchungen von GLASS et al. (1992) auch noch bei niedrigen pH-Werten von 4,0 und ebenso bei höheren pH-Werten von 9,0; das pH-Optimum liegt bei ca. 7,0.

Aufgrund der Fähigkeit der Säureadaptation („acid shock response“ und „acid tolerance response“: BRUDZINSKI und HARRISON, 1998) wird die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O157 gesteigert. Dieser zweiphasige Resistenzmechanismus ist induzierbar und schützt zusätzlich einige *E. coli* O157-Stämme gegen den hemmenden Einfluss von Natriumchlorid (GARREN et al., 1998). Werden *E. coli*-Zellen zunächst niedrigen pH-Werten (< 5,0) ausgesetzt, so können sie anschließend in Lebensmitteln mit noch niedrigeren pH-Werten wie Rohwürsten oder Apfelsauce bzw. auch die Magen-Darmpassage besser überleben (LEYER et al., 1995; ULJAS und INGHAM, 1998). Dieses Phänomen kann beobachtet werden, wenn über Kreuzkontamination *E. coli* O157 von rohem Fleisch (niedriger pH-Wert) z. B. in Ketchup (niedrigerer pH-Wert als Fleisch) gelangen oder Schlachttierkörper mit organischen Säuren behandelt werden (GARREN et al., 1997). Ein Überleben der Erreger wird - wie bereits erwähnt - neben der Säureadaptation zusätzlich durch eine Lagerung des kontaminierten Lebensmittels bei niedrigen Temperaturen (5 °C) gefördert (TSAI und INGHAM, 1997).

Salze:

E. coli O157 werden erst ab einer NaCl-Konzentration von $\geq 8,5$ % abgetötet (GLASS et al, 1992). Sie sind damit sehr salztolerant. Der D-Wert für *E. coli* O157:H7 für den Temperaturbereich von 54 °C bis 65 °C sinkt geringer bei einer Salzkonzentration von 8,5 % im Vergleich zu 0,5 %. Eine erhöhte Salzkonzentration hat somit eine protektive Wirkung auf *E. coli* O157 bei Einwirkung von Hitze (BLACKBURN et al, 1997).

Wasseraktivität:

Der a_w („activity of water“)-Wert-Grenzbereich für ein Wachstum liegt bei 0,95, mit einem Optimum von 0,995 (ICMSF, 1996). Allerdings können *E. coli* O157:H7 noch bei a_w -Werten, die weit unter diesen Werten liegen, überleben (DENG et al., 1998).

Nach Untersuchungen von MÜLLER et al. (1998) mit unterschiedlichen Rohwurstzeugnissen (Teewurst, kurzgereifte und langgereifte Salami), deren a_w -Wert zwischen 0,97-0,79 lag, konnte demonstriert werden, dass im Laufe der Reifung die in sehr geringen Konzentrationen eingemischten EHEC-Prüfstämme zwar zurückgedrängt wurden, aber über Anreicherungsverfahren und/oder PCR weiterhin regelmäßig zu rekultivieren bzw. nachzuweisen waren. Selbst nach mehrwöchiger Lagerung zeigten die Reisolat, mit lediglich einer Ausnahme, das volle Virulenzspektrum.

Desinfektion:

E. coli O157 sind wie andere *E. coli* empfindlich gegenüber gängigen Desinfektionsmitteln wie z. B. den im Lebensmittelbereich häufig verwendeten quaternären Ammoniumverbindungen und Amphotensiden. Eine Chlor-Lösung (1,1 mg/l freies Chlor und 1,2 mg/l Gesamt-Chlor) ist für eine Wasserdesinfektion ausreichend (RICE et al., 1999b; SWERDLOW et al., 1992). *E. coli* O157:H7 können aber beispielsweise auf einer Stahloberfläche eines Fleischwolfes haften und sogar überleben, auch wenn dieser desinfiziert, aber zuvor nicht ausreichend gereinigt wurde (FARRELL et al., 1998).

Überleben in der Umwelt:

Nach Untersuchungen von KUDVA et al. (1998) können *E. coli* O157:H7 bis zu 21 Monate in Dung überdauern. Somit ist die Gefahr gegeben, dass zum einen Lebensmittel wie Gemüse und Obst durch Düngung, zum anderen aber auch Tiere bei Weidegang nach Düngung der Weidefläche kontaminiert bzw. infiziert werden, wenn der Dung nicht entsprechend behandelt und ausreichend lange gelagert wird (WANG et al., 1996). Ein Studie von HANCOCK et al. (1997) konnte allerdings zeigen, dass Rinder, die auf mit Rinderkot behafteten Weideflächen grasten oder über Futtergras *E. coli* O157 ausgesetzt waren, keine höhere Kontaminationsrate aufwiesen als Kontrolltiere. Im Widerspruch dazu haben BÜLTE et al. (2002) bei einer Untersuchung in einer Mutterkuhherde demonstriert, dass die Anzahl von VTEC-positiven sowie darunter befindlichen O157-ausscheidenden Tieren nach einem Wechsel von Stallhaltung zu Weidehaltung erheblich ansteigen kann.

Auch Badewasser von Schwimmbädern oder Seen kann als Kontaminationsquelle eine Rolle spielen (CDC, 1999; CDC, 2000 und CDC, 2001). *E. coli* O157:H7 können auch gerade bei kälteren Temperaturen (ca. 8 °C) mehrere Monate in Wasser überleben (WANG und DOYLE, 1998).

2.2.2.6 Bedeutung von *E. coli* O157 als Krankheitserreger beim Menschen

Bei den EHEC-Infektionen spricht man auch von einer Krankheit der Industrieländer, deren Entstehung in den letzten Jahrzehnten durch Veränderungen in der Lebensweise der Menschen begünstigt worden ist. Zusammenleben auf engstem Raum, internationaler Tourismus (VILA et al., 1997), eine hochentwickelte Landwirtschaft und veränderte Lebensmitteltechnologien und Essgewohnheiten (z. B. „Fast-Food“, „Convenience“-Produkte) stellen beeinflussende Faktoren dar. So scheinen Nischen für „neue Erreger“ zu entstehen (NOTERMANS und BORGDORFF, 1997).

Neuerdings wird diskutiert, ob nicht - wie bisher angenommen - die nördliche Hemisphäre als der Ursprung von *E. coli* O157 anzusehen ist, sondern Lateinamerika, wo es bereits seit 1966 eine sehr hohe Inzidenz an HUS-Erkrankungen gibt (GIANANTONIO et al., 1966). Bei Kleinkindern liegt diese Rate bei 22 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (LÓPEZ et al, 1997). In der Bundesrepublik Deutschland liegen für das Jahr 1997 die EHEC-Inzidenzraten zwischen 0,3 und 1,2 pro 100.000, in Bayern bei 2,5 pro 100.000 (ANON., 1998a). Für das Jahr 2001 liegt die durchschnittliche Inzidenz bei 1,2 Fällen pro 100.000 Einwohner. Die höchste Inzidenz wurden in Bayern mit 1,6 pro 100.000, in Sachsen-Anhalt mit 1,7 pro 100.000 und in Bremen mit 1,8 pro 100.000 registriert (ANON., 2002b). In anderen europäischen Ländern wie Großbritannien lag 1994 in den Regionen England und Wales die EHEC O157-Inzidenzrate bei 0,8 pro 100.000, während sie in Schottland bei durchschnittlich 2,4 pro 100.000 lag (SIMMONS, 1997). In außereuropäischen Ländern, wie beispielsweise Kanada, wurde zwischen 1992 und 1995 eine EHEC O157-Inzidenzrate von etwa 4,6 pro 100.000 (SPIKA et al., 1998) beobachtet. Hier gab es sogar Gebiete mit Werten über 10/100.000. In den USA wurden für 1994 und 1995 Inzidenzraten von etwas über 3/100.000 gemeldet, 1993 kam es durch einen

großen Ausbruch zu einer Steigerung von *E. coli* O157:H7-Infektionen auf etwa 9 pro 100.000 (TARR et al., 1997).

Nach einer groß angelegten Studie der „Centers for Disease Control and Prevention (CDC)“ in den Jahren 1998, 1999 bzw. 2000 waren EHEC in 42, 38 bzw. 69 Ausbrüchen beteiligt, wobei 777, 1897 bzw. 1564 Personen erkrankten. Nur im Jahre 1999 wurden *E. coli* non-O157-Stämme (O111:H8 und O121) als Erreger isoliert (CDC, 1999; CDC, 2000 und CDC, 2001). In den nordamerikanischen Ländern und auch im britischen Raum werden nach wie vor fast ausschließlich *E. coli* der Serogruppe O157 nachgewiesen. In den USA dominiert der Serotyp O157:H7 bei HUS-Erkrankungen (TARR et al., 1997). Untersuchungen auf EHEC in England und Wales von 1992-1994 zeigten beim Vergleich der erfassten Serogruppen eine vorherrschende Dominanz der Serogruppe O157 von 99 % (THOMAS et al., 1996).

In den Niederlanden wurden zwischen 1999 und 2001 93 Fälle von symptomatischen EHEC O157-Infektionen gemeldet, davon 25 % bei Kindern unter vier Jahren. Serotypisierung und Verotoxin-Nachweis zeigten eine Dominanz von zwei Typen: O157:H7, VT2-positiv (25 %) und O157:H⁻, VT1- und VT2-positiv (24 %) (VAN DUYNHOVEN et al., 2002).

Sporadische Erkrankungen sowie Ausbrüche wurden zwar auch aus verschiedenen afrikanischen Ländern berichtet (GERMANI et al., 1997). Die Verbreitung von EHEC ist hier aber weitgehend unbekannt bzw. nicht erforscht.

In der Bundesrepublik Deutschland werden regelmäßig Erhebungen zur Epidemiologie von EHEC-Infektionen durchgeführt und veröffentlicht. Bei Stuhluntersuchungen von Enteritispatienten unter 16 Jahren in Würzburg zeigten die Ergebnisse für 1991-1994 eine deutliche Zunahme der Infektionen von 0,4 auf 2,8 %, die sich 1995 nicht mehr fortsetzte. In den Jahren 1991-1994 und 1997 erwiesen sich EHEC nach *Salmonella* und vor *Campylobacter* als zweithäufigste bakterielle Enteritiserreger (BOCKEMÜHL und KARCH, 1996; BOCKEMÜHL et al., 1998). Im Jahr 2001 lag die Anzahl aller gemeldeter EHEC-Fälle bei 1.288. Dieser Wert entspricht einer Zunahme von 18 % gegenüber den registrierten Meldungen im Jahr 2000 (1.088 Meldungen) und 31 % gegenüber dem Wert für 1999 (982 Meldungen)

(ANON., 2002b). Hierzulande werden neben dem Prototyp der EHEC, *E. coli* O157:H7, auch andere EHEC-Serotypen nachgewiesen (KARCH et al., 1997; ANON., 2002b).

1996 wurden erstmals *E. coli* O103:H2-Stämme isoliert (BOCKEMÜHL et al., 1997). Dieser Serotyp war zuvor bereits in Frankreich in Erscheinung getreten (MARIANI-KURKDJIAN et al., 1993).

1997 trat als dritthäufigster HUS-Erreger die Serogruppe O145 in Erscheinung. Auch für 1997 setzte sich der Trend fort, dass der Anteil an *E. coli* O157:H7 und O157:H⁻-Infektionen abnahm, während die Serotypenvielfalt weiterhin zunahm. Insgesamt waren vor allem bei den HUS-Erkrankungen überwiegend VT2-Bildner beteiligt (BOCKEMÜHL et al., 1998).

Zwischen 1994 und 2000 wurden Sorbit-fermentierende *E. coli* O157:H⁻ von 3,2 bis 17,7 % der HUS-Patienten und 1,5 % der Durchfall-Patienten isoliert (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001).

Im Jahr 2001 gehörten von 510 EHEC-Fällen, bei denen der Erreger kulturell isoliert wurde und Angaben zur Serogruppe vorliegen, 59 % der Erreger zu einer der drei häufigsten Serogruppen: O157 (30,6 %), O103 (16,3 %) und O26 (12,2 %). Unter diesen 510 angegebenen Fällen mit kultureller Isolierung befanden sich auch die HUS-Fälle, bei denen ein Erregernachweis gelang. Betrachtet man nur diese HUS-Fälle, so wurden bei 78,1 % der Erreger die Serogruppe O157, bei 7,3 % O26 und bei 2,4 % O103 ermittelt (ANON., 2002b).

Über die Saisonalität der Erkrankungen gibt es verschiedene Aussagen. Häufiger wurde berichtet, dass Infektionen hauptsächlich in den Sommermonaten auftreten (BEUTIN, 1996; MEAD und GRIFFIN, 1998). Rinder und Schafe zeigen auch hohe Ausscheidungsraten im Frühling und Sommer (HEUVELINK et al., 1998a; CHAPMAN et al., 1997; LAHTI et al., 2001). Die HUS-Epidemie in Bayern 1995/1996 hingegen hatte ihren Höhepunkt in den Monaten Dezember bis März (ANON., 1996b).

Die minimale infektiöse Dosis liegt sehr niedrig. Nach dem *E. coli* O111-Ausbruch in Australien über den Verzehr von Mettwurst wurden *E. coli* O111:H⁻-Keimzahlen von

nur einer Kolonie-bildenden Einheit pro 10 g Lebensmittel vermutet (PATON et al., 1996). Ein weiteres Indiz für eine sehr niedrige Infektionsdosis wird durch die Ausbrüche nach Kontakt mit Badewasser erklärt, wo eingebrachte Verunreinigungen in einer großen Menge Wasser verdünnt werden bzw. wurden (WANG und DOYLE, 1998).

Zu den Risikogruppen zählen Kinder unter zehn, besonders unter sechs Jahren, alte Menschen (> 60 Jahre), Schwangere und allgemein immunsupprimierte Personen. Man spricht auch von der YOPIS-Gruppe („young, old, pregnant, immunocompromised segments of the public“) (MOSSEL und STRUIJK, 1993). In Deutschland lag die Inzidenzrate für HUS bei Kindern unter 15 Jahren in den Jahren 1997-2000 bei 0,7 pro 100.000 (GERBER et al., 2002). Bei kleinen Kindern treten zu 5-10 % extraintestinale Komplikationen wie das HUS auf (BEUTIN, 1996). Das Darmepithel und die Darmflora von Kindern scheinen noch nicht vollständig entwickelt zu sein und bieten somit keine ausreichende Schutzbarriere. KURIOKA et al. (1998) entwickelten diese These, da im Tierversuch mit jungen Mäusen 75 % der Tiere, die bei einer speziellen Diät (Protein-Kalorien-Fehlernährung) gehalten wurden, verendeten. In der Kontrollgruppe hingegen konnte dieses nicht beobachtet werden.

Begünstigende Faktoren bzw. Risikofaktoren, die zu einer schweren klinischen Erkrankung führen können, stellt die Einnahme von Medikamenten wie Darm-Motilitätshemmer (MEAD und GRIFFIN, 1998) und Antibiotika dar (WONG et al., 2000). Zunehmend wird diskutiert, ob nicht auch Personen im ländlichen Bereich, die häufigen Umgang mit Tieren haben, einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, an einer EHEC-Infektion zu erkranken (TOZZI et al., 1994). SPIKA et al. (1998) konnten zeigen, dass die höchste Inzidenz von EHEC-Infektionen in ländlichen Regionen Kanadas, die einen großen Rindviehbestand aufwiesen, zu beobachten war. WILSON et al. (1997) konnten ähnliche Beobachtungen machen. Ebenso sind Personen, die auf Schlachthöfen arbeiten und direkten Kontakt zu den Tieren bzw. Schlachttierkörpern haben, einem erhöhten Infektionsdruck ausgesetzt (STEPHAN, 1998). Als symptomlose Ausscheider können sie eine Infektionsquelle darstellen (WILSON et al., 1997).

Eine Geschlechtsdisposition wird von den meisten Autoren als nicht gegeben diskutiert. MEAD und GRIFFIN (1998) allerdings vermuten eine Prädisposition für weibliche Personen. Nach Angaben des RKI aus dem Jahr 2001 (ANON., 2002a) war die Inzidenz von EHEC-Erkrankungen inklusive HUS bei weiblichen Personen ca. 50 % höher als bei männlichen.

2.2.2.6.1 Klinisches Bild einer EHEC-Infektion

Die klinischen Erscheinungen einer durch EHEC bedingten Infektion beim Menschen hängen, wie bei anderen pathogenen Mikroorganismen auch, ganz wesentlich von der individuellen Immunitätslage ab. Sie können als milde, aber auch als hämorrhagische Diarrhöen mit schwer therapierbaren Folgekomplikationen verlaufen.

Im Durchschnitt treten nach drei bis fünf bis hin zu neun Tagen nach Infektion kolikartige Darmkrämpfe mit einer nachfolgenden wässrigen Diarrhöe auf. Gelegentlich wird leichtes Fieber und Erbrechen festgestellt. In etwa 70-90 % der Fälle kommt es zu einem blutigen Durchfall. Andere Autoren geben eine niedrigere Inzidenz von blutigem Durchfall an (BOCKEMÜHL et al., 1997). Bei Ausbleiben von Komplikationen heilt die Erkrankung nach etwa einer Woche ab, allerdings stellt der blutige Durchfall ein Risikofaktor für extraintestinale Komplikationen dar (NATARO und KAPER, 1998; MEAD und GRIFFIN, 1998). Bei ca. 5-10 % bis hin zu 20 % der Fälle, insbesondere bei Kindern unter sechs Jahren, kommt es zum Hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS), zur Thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP; synonym: Moschcowitz-Syndrom) und/oder zu neurologischen Komplikationen (KARCH und BOCKEMÜHL, 1989). Das klinische Bild eines HUS ist definiert als Trias folgender Symptome: akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie (NATARO und KAPER, 1998).

Neben diesen Hauptsymptomen wird eine Beteiligung von EHEC bei Fällen von Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Harnwegsinfektionen diskutiert (BEUTIN et al., 1994). Zu den intestinalen Komplikationen zählen eine chronische Colitis beim adulten Menschen sowie eine nekrotisierende Colitis und eine Darminvagination beim Säugling. Extraintestinale Komplikationen stellen hämolytische Anämien,

toxischer Myokardschaden, Pankreatitis und Multiorganversagen dar (BOCKEMÜHL et al., 1997).

10-30 % der HUS-Fälle enden mit lebenslangen Schäden wie Bluthochdruck oder terminaler Niereninsuffizienz, die zu einer Dialysepflicht oder Nierentransplantation führen kann, und bei etwa 10 % mit dem Tod des Patienten (NEILL, 1991). Das enteropathische HUS wird fast ausschließlich bei Kleinkindern beobachtet. Erkrankungen von älteren Menschen sind in den letzten Jahren zunehmend bekannt geworden. Die Mortalitätsrate bei älteren HUS-Patienten kann dann sogar bei 50 % liegen (FEATHERSTONE, 1997). *E. coli* O157 werden überwiegend im Zusammenhang mit schweren Durchfallerkrankungen und extraintestinalen Komplikationen wie dem HUS vor allem bei Kleinkindern beobachtet (BEUTIN, 1996).

Die Erregerausscheidung dauert in der Regel 5-20 Tage. Eine genaue Diagnosestellung bzw. der Nachweis von EHEC aus dem Stuhl gestaltet sich häufig schwierig, da die Erreger bis zum Auftreten eindeutiger Symptome im Stuhl überhaupt nicht mehr nachweisbar sind oder in so geringen Anteilen vorliegen, dass sie mit laborüblichen Nachweismethoden nicht mehr erfasst werden (MEAD und GRIFFIN, 1998). In diesen Fällen ist der Nachweis von Antikörpern (Immunglobulin M und G) aus Blutserum zumindest gegen das O157-Antigen sinnvoll (KARCH et al, 1996). Allerdings lässt sich nicht exakt feststellen, ob ein positiver Antikörpertiter nicht auf eine länger zurückliegende Erkrankung zurückzuführen ist. Zudem werden Stuhlproben regelmäßig nicht hinsichtlich einer eventuell vorliegenden EHEC-Infektion untersucht. Häufig werden die Untersuchungen nur auf den Nachweis der Serogruppe O157 beschränkt; die non-O157-EHEC werden nicht berücksichtigt (SORDILLO und NUSBAUM, 1996).

2.2.2.6.2 Der Mensch als symptomloser Ausscheider

Dem Menschen als Träger und symptomlosen Ausscheider von EHEC kommt eine größere Rolle zu als in der Vergangenheit vermutet. Die verschiedenen Länder reagieren unterschiedlich auf die aufgetretenen Ausbrüche. So wurde in Deutschland beispielsweise nach der sogenannten „HUS-Epidemie“ 1996 die Meldepflicht in Bayern für EHEC-Ausscheider eingeführt. Eine bundesweite Meldepflicht für EHEC-

Infektionen besteht seit dem 09.11.1998 (ANON., 1998b). Nach Einführung der Meldepflicht konnten beispielsweise im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen 40 symptomlose Ausscheider ermittelt werden (BOCKEMÜHL et al., 1997). EHEC gehören beim Menschen zur transienten Darmflora.

In der Regel beträgt die Ausscheidungsdauer bis zu drei Wochen nach Erkrankung. Es sind aber auch längere Ausscheidungsintervalle - zum Teil intermittierend - von über 30 Tagen bis hin in Ausnahmefällen zu 124 Tagen (KARCH et al., 1995) bekannt geworden. Der häufig nur geringe Anteil an EHEC an der gesamten *E. coli*-Flora im Stuhl, die ohne weiteres um zwei Zehnerpotenzen höher liegen kann, erschwert zusätzlich den Nachweis von EHEC.

Hier ist es aber möglich, über den bereits erwähnten Nachweis von Antikörpern im humanen Serum eine Aussage über eine vermutete EHEC-Infektion zu treffen (GREATOREX und THORNE, 1994). Allerdings werden in Serum von Menschen, die häufiger mit VTEC in Berührung kommen, im Vergleich zu Kontrollpersonen häufiger Antikörper gegen die Verotoxine oder gegen Lipopolysaccharid-Antigene von bestimmten Serogruppen nachgewiesen. So konnten REYMOND et al. (1996) zeigen, dass Personen, die regelmäßigen „Kontakt“ zu Milchviehbetrieben hatten, im Vergleich zur Stadtbevölkerung eine vielfach höhere Antikörperreaktion zeigten. Auch wenn sie selbst nicht erkranken, so stellen sie doch als symptomlose Träger ein Risiko beispielsweise für Familienangehörige dar. Die Problematik von symptomlosen Ausscheidern spielt ebenso eine Rolle für die Lebensmittel-gewinnende bzw. -verarbeitende Industrie. So konnte STEPHAN (1998) in der Schweiz aus Stuhlproben von 74 Personen, die in einem Schlachthof arbeiten, zu 9 % VTEC nachweisen.

2.2.2.6.3 Therapie

Am wichtigsten ist eine frühzeitige symptomatische Behandlung und Überwachung zur Prävention von Komplikationen wie dem Nierenversagen. Frühere Veröffentlichungen eröffneten die These, dass Antibiotika sowohl einen positiven als auch einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnten (GRIFFIN und TAUXE, 1991). Nach neueren Erkenntnissen ist eine antibiotische Behandlung nicht

indiziert (KARCH, 1997). Antibiotika können die Entstehung von HUS bei Kindern begünstigen (WONG et al., 2000), die Erregerausscheidung verlängern und die Toxinbildung stimulieren bzw. eine Toxinfreisetzung bewirken (siehe auch Abschnitt 2.2.1.3). Ebenso können Zytostatika die Toxinproduktion und -freisetzung *in vitro* stimulieren (BITZAN und KARCH, 1992). TAKEDA et al. (1998) konnten hingegen zeigen, dass frühe Behandlung mit Fosfomycin mit einer Senkung der HUS-Inzidenz assoziiert ist. Motilitätshemmer sind grundsätzlich kontraindiziert, da sie die intestinale „Clearance-Rate“ herabsetzen, und damit die Toxinabsorption erhöhen (CIMOLAI et al., 1994).

Adulte große Wiederkäuer scheinen durch Antitoxine geschützt zu sein, da sie Träger von EHEC sind, aber nicht erkranken. In einer Studie mit 11 Rinderherden (225 Tiere) wurde gezeigt, dass aus dem Kolostrum von Kühen Antitoxin-Antikörper zu 84 % nachweisbar waren (PIRRO et al., 1995). Immunglobulinpräparate aus Kuhmilch könnten daher - allerdings nur im Frühstadium einer EHEC-Erkrankung - als Therapeutikum eingesetzt werden (LISSNER et al., 1996).

In den letzten Jahren ist verstärkt die Entwicklung von Impfstoffen gefördert worden. AGIN und WOLF (1997) sehen die Bildung von Intimin als Voraussetzung für die volle Entfaltung der Pathogenität an. Auf dieser Basis scheint nach deren Meinung der Einsatz einer polyvalenten Vakzine, die die Produktion von anti-Intimin-Antikörpern gegen Hauptgruppen des Intimins sowohl von EHEC als auch von EPEC stimulieren, sinnvoll. Eine Vakzine könnte somit gleichzeitig beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten eingesetzt werden.

Ebenso ist der Einsatz von Toxoidimpfstoffen denkbar. BIELASZEWSKA et al. (1997) konnten im Tierversuch mit Kaninchen eine hohe Wirksamkeit von Impfstoffen, hergestellt aus der A-Untereinheit von VT1 oder VT2, beobachten. Hierbei kam es zu einer Kreuzreaktion bzw. -neutralisation beider Toxine. BAST et al. (1997) sehen den Einsatz von einem aus veränderten B-Toxinuntereinheiten entwickelten Impfstoff als vielversprechend an, der die Bindung des Toxins an den Gb₃-Rezeptor verhindert und die Rezeptoranzahl herabsetzt.

ISOgai et al. (1998) diskutierten grünen Tee als Mittel zur Verhütung einer EHEC-Infektion. Im Tierversuch mit gnotobiotischen Mäusen konnte nämlich gezeigt werden, dass die im Tee enthaltenen Catechine das Wachstum von EHEC bzw. eine Kolonisation des Darmes mit EHEC verhinderten. Bakterizide Wirkungen sind auch von Gewürzen wie Knoblauch und Nelken bekannt.

2.2.2.7 Bedeutung als Krankheitserreger für das Tier

VTEC werden häufiger bei Kälbern und Ferkeln nachgewiesen, die an einer Diarrhöe erkrankt sind (WIELER et al., 1992 und WIELER et al., 1996), seltener bei Fohlen (HOLLAND et al., 1996).

Tiere entwickeln keine extraintestinalen Symptome wie ein HUS, sondern erkranken an einer einfachen Diarrhöe oder zeigen keine deutlichen Symptome. Eine dauerhafte Immunität wird nicht entwickelt. In Tierversuchen mit sechs bis acht Wochen alten Kälbern, die künstlich mit *E. coli* O157:H7 inokuliert worden waren, wurden keine „AE-Läsionen“ im Darm beobachtet (BROWN et al., 1997). Bei neugeborenen Kälbern (< 36 h) hingegen konnten in einer anderen Studie derartige pathologisch-histologischen Veränderungen festgestellt werden (DEAN-NYSTROM et al., 1997). Die Ausprägung des klinischen Erkrankungsbildes ist abhängig vom Alter bzw. Immunstatus des Tieres.

Die Inzidenz von VTEC bei Mastitiden bei Rindern liegt in Deutschland bei etwa 0,5 % (ZSCHÖCK et al., 1998). Sie spielen offenbar bei *E. coli*-Mastitiden keine Rolle.

2.2.2.8 Vorkommen bei Tieren

Eine sehr heterogene Gruppe von *E. coli* wird beim Tier und auch beim Menschen nachgewiesen. Viele Stämme scheinen spezifisch für ihren Wirt zu sein. Manche Autoren sind der Auffassung, dass bei Geflügel und gesunden Haustieren (außer Wiederkäuern) und auch beim Menschen VTEC normalerweise nicht oder nur sehr selten vorkommen (BEUTIN et al., 1993 und BEUTIN et al., 1995). Verschiedene Tierarten können aber Träger und damit Überträger von VTEC bzw. präsumtiven

EHEC sein, ohne unbedingt selbst an EHEC zu erkranken. Der große und kleine Wiederkäuer spielt dabei eine besondere Rolle.

Die Tabellen 2-2, 2-3 und 2-4 zeigen die Isolationsrate von VTEC aus Kotproben verschiedener Tierarten aus mehreren Ländern.

Tabelle 2-2: Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von verschiedenen Tierarten (Europa)

Land	Jahr	Tiere	Anzahl	positive Kotproben (%)		Quelle
				O157	non-O157	
Finnland	1997	Schlachtrinder	1.448	19 (1,3)	n.u. ¹	LAHTI et al., 2001
Frankreich	1997-1998	Rinder	471	162 (34,0) ²		PRADEL et al., 2000
Großbritannien	1995-1996	Schlachtrinder	4.800	749 (15,6)	n.u.	CHAPMAN et al., 1997
		Schlachtschafe	1.000	22 (2,2)	n.u.	
		Schlachtschweine	1.000	4 (0,4)	n.u.	
		Schlachtgeflügel	1.000	0	n.u.	
	1997-1998	Schlachtrinder	4.800	619 (12,9)	n.u.	CHAPMAN et al., 2001
		Schlachtschafe	7.200	100 (7,4)	n.u.	
Italien	1997-1998	Tauben	649	0	70 (10,7)	MORABITO et al., 2001
Niederlande	1996	Kälber (≤ 1 Jahr)	197	33 (16,8)	n.u.	HEUVELINK et al., 1998b
		Rinder (> 1 Jahr)	587	42 (7,2)	n.u.	

Fortsetzung Tabelle 2-2:

Land	Jahr	Tiere	Anzahl	positive Kotproben (%)		Quelle
				O157	non-O157	
Niederland	1995-1996	Schlachtrinder (adult)	540	57 (10,6)	n.u.	HEUVELINK et al., 1998a
		Schlachtkälber	397	2 (0,5)	n.u.	
		Schlachtschafe	52	2 (3,8)	n.u.	
		Schlachtlämmer	49	2 (4,1)	n.u.	
	1997-1998	Schlachtschweine	145	1 (0,7)	n.u.	HEUVELINK et al., 1999a
	2000	Geflügel (Zootiere)	37	2 (5,4)	n.u.	HEUVELINK et al., 2002
		Ziegen (Zootiere)	94	2 (2,1)	n.u.	
Norwegen	1998-1999	Rinder	1.541	3 (0,2)	n.u.	JOHNSSEN et al., 2001
		Schafe	665	0	n.u.	
		Schweine	1.976	2 (0,1)	n.u.	
Spanien	1994	Kühe	257	0	52 (20,2)	BLANCO et al., 1996
		Kälber	71	1 (1,4)	15 (21,1)	
	1992-1993	Geflügel (Hühner)	167	0	0	BLANCO et al., 1997

¹ nicht untersucht ² nur ein Isolat des Serotyps O157:H7

Tabelle 2-3: Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von verschiedenen Tierarten (Bundesrepublik Deutschland)

Jahr	Tiere	Anzahl	positive Kotproben (%)		Quelle
			O157	non-O157	
1987	Mastbullen	212	2 (0,9)	18 (8,4)	MONTENEGRO et al., 1990
	Milchkühe	47	0	8 (17,0)	
1990	Milchrinder	206	0	23 (11,2)	BÜLTE und WROCKLAGE, 1992
	Damwild	100	0	10 (10)	
	Mastschweine	101	5 (5)		
1988-1990	Rinder	142	0	30 (21,1)	BEUTIN et al., 1993
	Schafe	120	0	80 (66,6)	
	Schweine	120	0	9 (7,5)	
	Ziegen	66	0	37 (56,1)	
	Hunde	63	0	3 (4,8)	
	Katzer	65	0	9 (13,8)	
	Geflügel (Hühner)	144	0	0	
1996	Rinder	372	2 (0,5)	78 (21,0)	WEBER et al., 1997
1995-1996	Schlachtrinder	204	0	97 (47,6)	RICHTER et al., 1997
1998-1999	Rinder	2.163	810 (37,4)		GEUE et al., 2002

Tabelle 2-4: Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von verschiedenen Tierarten (außerhalb von Europa)

Land	Jahr	Tiere	Anzahl	positive Kotproben (%)		Quelle
				O157	non-O157	
Australien	?	Milchkühe	294	1 (0,3)	32 (10,9)	COBBOLD und DESMARCHELIER, 2001
		Kälber	79	1 (1,3)	12 (15,2)	
		Absatzkälber	109	7 (6,4)	40 (36,7)	
		Färsen	106	3 (2,8)	32 (30,2)	
Japan	1998	Möwen	50	0	1 (2,0)	MAKINO et al., 2000
Kanada	1996	Kühe	38	6 (16)	n.u. ¹	GANNON et al., 2002
	1997	Kühe	50	13 (26)	n.u.	
	1997	Kälber	52	13 (25)	n.u.	
USA	1997	Hirsche	609	3 (0,5)	n.u.	FISCHER et al., 2001
	1998-1999	Rinder	305	13 (4,3)	n.u.	

¹ nicht untersucht

Wiederkäuer (Nutztierhaltung):

Große und kleine Wiederkäuer, wie Rinder, Schafe und Ziegen, stellen das Hauptreservoir für VTEC dar. Eine Vielzahl von Tieren ist Träger von gleichzeitig verschiedenen VTEC-Stämmen bzw. -Serotypen (BEUTIN et al., 1993; BEUTIN et al., 1997; WELLS et al., 1991; DJORDJEVIC et al., 2001). Immer wieder werden darunter auch Stämme bzw. Serotypen, die als humanpathogen bekannt sind, entdeckt (BALJER et al., 1990).

Fütterungsversuche haben gezeigt, dass bestimmte Fütterungsarten und gerade auch eine restriktive Fütterung - wie sie beispielsweise kurz vor der Schlachtung durchgeführt wird - auf die intestinale *E. coli*-Flora Einfluss nehmen können (BEUTIN et al., 1997; CRAY et al., 1998). Es kann unter diesem Einfluss in Verbindung mit Stress zu einer erhöhten Ausscheidung von *E. coli* und damit VTEC kommen. Der Einsatz von physiologischen *E. coli*-Stämmen als Probiotikum senkt nach Untersuchungen von ZHAO et al. (1998), vermutlich über die Wirkung von produziertem Colicin, und reduziert die Ausscheidungsdauer von EHEC wie *E. coli* O157:H7 bei Kälbern. Im Widerspruch dazu haben SAAD und FRANCO (1999) keine Wachstumshemmung von *E. coli* O157:H7 durch apathogene *E. coli* in rohem Rinderhackfleisch beobachtet. Bei dem Wechsel von Aufstallung im Spätherbst und Weidegang in den Sommermonaten, der mit einer veränderten Fütterung einhergeht, konnte bei Rindern und Schafen eine Steigerung der VTEC-Infektion beobachtet werden. (HEUVELINK et al., 1998a; CHAPMAN et al., 1997). In einer Studie von KUDVA et al. (1997) war die Nachweisrate von VTEC in Schaffäzes von Gras-gefütterten Tieren deutlich höher als bei mit Mais und getrocknete Alfalfa gefütterten, vermutlich aufgrund des bei der zweiten Fütterungsform auftretenden höheren gastrointestinalen pH-Wertes.

Eine Reihe von Serotypen werden sowohl beim Menschen als auch beim Tier nachgewiesen. Auch das im Vergleich zu VTEC-Stämmen vom Schwein häufiger nachgewiesene *eae*-Gen bei Isolaten von Rindern scheint ein Hinweis dafür zu sein, dass Rinder ein wichtiges Erregerreservoir darstellen (GANNON et al., 1993).

E. coli O157:H7-/H⁻-Stämme werden im Gegensatz zu anderen Serotypen bzw. -gruppen, die ebenso wie *E. coli* O157 bereits im Zusammenhang mit Erkrankungsfällen von Menschen bekannt geworden sind, seltener beim adulten Rind, aber häufiger bei jüngeren Tieren nachgewiesen (BLANCO et al., 1996). Kälber scheiden *E. coli* O157:H7 länger als adulte Tiere aus, was sich vermutlich durch das noch nicht vollständig entwickelte Vormagensystem erklären lässt. Beim adulten Tier hingegen hemmt z. B. der niedrige pH im Vormagensystem das Wachstum der Erreger (CRAY und MOON, 1995; RASMUSSEN et al., 1993; WELLS et al., 1991).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Untersuchungen von diarrhöischen Kälbern häufiger Intimin-Bildner nachzuweisen sind; diese sind überwiegend mit dem VT1 assoziiert (MAINIL et al., 1993; WIELER et al., 1996). VTEC sind häufiger bei Kälbern mit Diarrhöe nachzuweisen als bei gesunden Kälbern. Tierversuche mit Kälbern zeigten, dass Intimin, welches über das *eae*-Gen kodiert wird, eine große Rolle für die Kolonisation, Ausbildung von AE-Läsionen und dem Erkrankungsbild spielt (DEAN-NYSTROM et al., 1998). In der Bundesrepublik Deutschland dominiert bei diarrhöischen Kälbern die Serogruppe O118 (WIELER et al., 1998). Überwiegend werden bei adulten Tieren VT2- und VT2c-Bildner nachgewiesen; diese sind etwa zu 14 % Prozent *eae*-positiv. Das *eae*-Gen wird selten bei gesunden Tieren gefunden (BLANCO et al., 1996; BEUTIN et al., 1997). Im Gegensatz dazu wird bei klinischen Isolaten, die vom Menschen abstammen, das *eae*-Gen zu ca. 95 % isoliert (BOCKEMÜHL und KARCH, 1996). Beim Schaf treten im Vergleich zum großen Wiederkäuer häufiger alleinige VT1- oder VT1- und gleichzeitig VT2-Bildner auf (BEUTIN et al., 1997).

Eine Studie von BEUTIN et al. (1993) konnte zeigen, dass VTEC-Isolate von großen und kleinen Wiederkäuern häufiger Enterohämolysin bildeten als Isolate von anderen Tierarten. Dieses könnte nach Meinung der Autoren ein weiterer Hinweis für die Pathogenität dieser VTEC-Stämme sein, so dass vor allem Stämme von Wiederkäuern ein größeres Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen als jene von anderen Tierarten. Sowohl beim großen als auch beim kleinen Wiederkäuer gibt es Serotypen, die kennzeichnend für eine Tierart zu sein scheinen, da sie gehäuft bei der jeweiligen Tierart zu isolieren sind.

Wie beim Menschen existiert die Problematik der Dauerausscheider. WELLS et al. (1991) konnten zeigen, dass Rinder bis zu 50 Tage *E. coli* O157:H7 mit dem Kot ausschieden. In einer Studie von HEUVELINK et al. (1998b) trat sogar eine Ausscheidungsdauer von etwa drei Monaten auf. Ebenso wurden intermittierende Ausscheidungen beobachtet (BROWN et al., 1997; MECHIE et al., 1997). Daher können Untersuchungsergebnisse je nach Zeitpunkt und Häufigkeit der Probenahme variieren. Die Nachweisrate von VTEC beim Vergleich von männlichen und weiblichen Tieren ist gleich (DARGATZ et al., 1997).

Die hohe Prävalenz von VTEC in Tierbeständen lässt den Wunsch nach VTEC- und damit EHEC-freien Beständen unrealisierbar erscheinen. Langzeitstudien von Herden, die Umgebungsuntersuchungen mit einbeziehen, ermöglichen zumindest die Aufdeckung von Infektionsquellen wie z. B. kontaminiertes Trinkwasser (SHERE et al., 1998). So könnte der Eintrag von VTEC in die Bestände durch entsprechende Maßnahmen verringert oder sogar verhindert werden.

In der Bundesrepublik Deutschland dominieren die non-O157-VTEC. Bei einer Kotuntersuchung in vier deutschen Rinderherden wurden VTEC bei 29-82 % der Rinder isoliert; dabei dominierten die VTEC-Serotypen O26:H11 und O165:H25. VTEC O157:H7/H⁻, VTEC O103:H2 und VTEC O145:H⁻ wurden nur sporadisch isoliert (GEUE et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten auch bei Tieren pathogene *E. coli* O157 nachweisen, sie stellten allerdings ebenfalls fest, dass die non-O157-VTEC dominieren (MONTENEGRO et al., 1990; WEBER et al., 1997; BÜLTE et al., 2002).

Schwein:

Eine große Rolle spielt bei dieser Tierart die Ödemkrankheit der Absetzferkel (APPEL et al., 1989). Im Tierversuch konnte über eine Inokulation mit humanpathogenen EHEC gezeigt werden, dass neugeborene gnotobiotische Ferkel neben Diarrhöen auch extraintestinale Symptome wie Hirnödeme und -läsionen zeigten, aber kein HUS entwickelten (FRANCIS et al., 1989). Somit stellt auch das Schwein kein optimales Tiermodell zur Untersuchung und Aufklärung von EHEC-Infektionen des Menschen dar. Vom Schwein isolierte Stämme treten nur selten im Zusammenhang

mit menschlichen Erkrankungen auf. 1991 berichteten PIÉRARD et al. von dem ersten klinischen Fall mit einem EHEC-Stamm, der VT2e bildete. Bei einer Untersuchung von DESROSIERS et al. (2001) konnte keine genetische Verwandtschaft zwischen VTEC-Isolaten humanen und porcinen Ursprungs festgestellt werden.

VTEC kommen beim Schwein zu 7,5 % vor (BEUTIN et al., 1993). CHAPMAN et al. (1997) konnte nur vier (0,4 %) *E. coli* O157-Stämme aus 1.000 Schweinekotproben isolieren.

Pferd:

Bei Pferden mit einer Diarrhøe können gelegentlich VTEC bzw. EHEC nachgewiesen werden (HOLLAND et al., 1996). Sie scheinen aber kein typisches Erregerreservoir darzustellen. In England wurde eine *E. coli* O157-Infektion bei einem 84jährigen Mann diagnostiziert, der sich über Kontakt zu einem Pferd infiziert hatte. Dieses Pferd war kurz zuvor an einer Diarrhøe erkrankt; im Kot des Tieres konnten *E. coli* O157 nachgewiesen werden (CHALMERS et al, 1997). In Deutschland wurde auch eine EHEC-Infektion mit dem Serotyp O157:H⁻ bei einem 15 Monate alten Jungen aus Bayern nachgewiesen. Stämme dieses Serotyps wurden auch aus eine Sammelkotprobe von Minipferden isoliert, mit denen der Junge regelmäßig in Kontakt kam (ANON., 1999).

In unserem Institut wurde ein Sorbit-fermentierender und β -D-Glucuronidase-positiver *E. coli*-Stamm aus Stutenmilch isoliert. Mittels ELISA und PCR zeigte sich dieser Stamm VT-positiv bzw. vtx2-positiv, vtx1-negativ und eae-negativ (GOLL, persönliche Mitteilung 2002).

Geflügel:

Obwohl in einer Studie von SCHOENI und DOYLE (1994) gezeigt werden konnte, dass Küken, die künstlich mit *E. coli* O157:H7 inokuliert wurden, bis zu 11 Monate diese Erreger ausschieden, sind diesbezügliche Infektionen über Lebensmittel vom Geflügel nicht bekannt. Selbst auf der Eierschale der von diesen Tieren stammenden

Eier konnten in dieser Studie *E. coli* O157 nachgewiesen werden, aber nicht in Eidotter und Eiweiß.

In einer Studie von BLANCO et al. (1997) konnten weder von an Koliseptikämie erkranktem Geflügel noch von gesunden Tieren VTEC isoliert werden.

HEUVELINK et al. (2002) konnte von zwei Puten aus einem Zoo EHEC O157 isolieren.

VTEC wurden bereits aus dem Kot von Tauben (SCHMIDT et al., 2000; MORABITO et al., 2001) und Möwen (MAKINO et al., 2000) isoliert.

Bei Untersuchungen von Taubenkot von insgesamt 649 gesunden Tieren konnten MORABITO et al. (2001) 10,8 % VTEC-positive Proben feststellen. Es wurden VT2f-Bildner isoliert, die zudem überwiegend das *eae*-Gen und CLDT aufwiesen.

Kleine Haustiere:

Bei Katzen und Hunden wurden ebenfalls VTEC nachgewiesen. *E. coli* O157-Stämme konnten in diesen Studien jedoch nicht ermittelt werden (BEUTIN et al., 1993). ABAAS et al. (1989) konnten vor 14 Jahren bei Katzen, die an Durchfall erkrankt waren, 95,7 % VTEC-ausscheidende Tiere nachweisen, in der Kontrollgruppe hingegen immerhin auch noch 40,0 %. POHL et al. (1993) konnten demonstrieren, dass ein EPEC-Isolat der Gruppe *E. coli* O26, das aus Kaninchenkot stammte, mit der VT1-Sonde reagierte. Andererseits konnten BLANCO et al. (1994) VTEC bisher weder bei Kaninchen mit noch ohne Diarrhöe nachweisen.

Wild- und Zootiere:

Erstmals wurden *E. coli* O157:H7 bei einem an einer Darminfektion erkrankten Menschenaffen nachgewiesen (BEUTIN et al., 1996). Dieser Stamm erwies sich in weitergehenden Untersuchungen jedoch als Verotoxin-negativ.

FISCHER et al. (2001) konnten die horizontale Übertragung von einem mit *E. coli* O157:H7 artifiziell infizierten Hirsch auf einen nicht infizierten demonstrieren. Bei der Autopsie wurde keine AE-Läsionen gefunden. Solche Stämme konnten weiterhin bei

einer Felduntersuchung an im Gehege gehaltenen Hirschen bei drei von 469 untersuchten Tieren aus dem Kot, nicht aber aus dem Fleisch isoliert werden.

BÜLTE und WROCKLAGE (1992) konnten bei Damwild zu 10 % VTEC-ausscheidende Tiere nachweisen. KEENE et al. (1997) berichteten von einem dreijährigen Kind, das 1995 nach Verzehr von Damwildfleisch an blutigem Durchfall erkrankte. *E. coli* O157:H7 wurde als Erreger identifiziert.

HEUVELINK et al. (2002) konnte VTEC O157 von Ziegen, Schafen, Hirschen, Färsen und Puten aus unterschiedlichen Zoos in den Niederlanden isolieren. Die Ziegen und Schafe waren vermutlich die Infektionsquelle für ein an HUS erkranktes Kind, da die Isolate des Kindes und dieser Tiere den gleichen Verotoxintyp und identische PFGE-Muster zeigten.

Sonstige:

Auch bei kleinen Nagetieren wie Mäusen und Ratten sowie bei Insekten (Fliegen) konnten bereits VTEC ermittelt werden (SEUFFER, 1997; RAHN et al., 1997). SHERE et al. (1998) konnten innerhalb einer Farm identische *E. coli* O157:H7-Stämme aus Rinderkot und aus Fliegen isolieren. Diese Funde deuten auf mögliche Infektketten hin.

2.2.2.9 Lebensmittel als Vektoren

Regelmäßig wird von sporadischen EHEC-Fällen, Familienerkrankungen oder Epidemien berichtet, bei denen Lebensmittel, wie Fleisch und Fleischerzeugnisse, Rohmilch, Käse, Apfelsauce, Weißkohlsalat, Kopfsalat und Wasser, als Überträger nachgewiesen oder zumindest vermutet werden konnten (CDC, 1999; CDC, 2000 und CDC, 2001). Grundsätzlich muss davon ausgegangen werden, dass sehr viele Lebensmittel, die roh oder nicht ausreichend erhitzt verzehrt werden, mit VTEC behaftet sein können.

Dass rohes bzw. nicht vollständig durchgegartes Fleisch ein Risiko im Hinblick auf eine EHEC-Erkrankung darstellt, belegten eindrucksvoll LÓPEZ et al. (1997). Nach

deren Angaben hat Argentinien die höchste jährliche HUS-Rate der Welt. Dieses ist insofern nicht verwunderlich, da bereits Kleinkinder ab dem fünften Monat mit Fleisch ernährt werden, und ca. 80 % des verzehrten Fleisches nicht vollständig durchgegart ist. Andere Verzehrsgewohnheiten stellen somit ein erhöhtes Risiko dar. Nach Aussage von PARRY et al. (1998) spielt somit die Aufklärung der Verbraucher dahingehend, dass sie beispielsweise keine nicht vollständig durchgegartenen „Hamburger“ verzehren, eine bedeutsame Rolle.

Immer wieder kam es in der Vergangenheit zu größeren Ausbrüchen mit hohen Mortalitätsraten, wie beispielsweise in Schottland im Jahr 1996 mit 20 Todesfällen von über 400 durch Verzehr von kontaminierten Fleischerzeugnissen bei den mit *E. coli* O157 erkrankten Personen (JACOB, 1998). In Barcelona wurde im Jahr 2000 der größte Ausbruch in der spanischen Geschichte durch Verzehr von Wurstwaren bekannt gegeben. 150 Kinder von vier Schulen und 31 Personen, die Kontakt mit diesen Kindern hatten, waren betroffen (ANON., 2001a).

„Hamburger“, ein Produkt aus reinem Rinderhackfleisch, traten vor allem in den USA immer wieder als Vektor in Erscheinung (CDC, 2000; CDC, 2001). Rinder sind schließlich als Hauptreservoir für VTEC bzw. präsumtive EHEC bekannt. Neben den Verzehrsgewohnheiten spielt hier aber auch das Ausgangsprodukt Hackfleisch zur Herstellung der „patties“ eine große Rolle. Der Zerkleinerungsgrad des Fleisches bewirkt eine homogene Verteilung eventuell vorhandener pathogener Erreger, die Zusammensetzung aus Teilstücken von mehreren Tieren kann Chargen von mehreren Tonnen kontaminieren, auch wenn ursprünglich nur ein Tier mit VTEC/EHEC behaftet war. Hinzu kommt, dass Hackfleisch ein ideales Vermehrungsmedium darstellt. Nur ein völliges Durchbraten des gesamten Hackfleisches kann ein sicheres Abtöten von EHEC bewirken (BRADFORD et al., 1994).

Japan war 1996 und 1997 von mehreren sporadischen EHEC-Fällen, aber auch von größeren Ausbrüchen betroffen. Immer wieder konnten Rettichsprossen als Vektor bestätigt oder zumindest vermutet werden (ANON., 1996a und ANON., 1997). Dabei wurden Stämme der Serotypen *E. coli* O157:H7 und O157:H⁻ nachgewiesen. Es

handelte sich 1996 um den weltweit größten bisher bekannt gewordenen Ausbruch mit ca. 9.000 Erkrankten, der durch EHEC verursacht wurde.

Milch und Käse können ebenfalls Überträger von VTEC sein (DJURETIC et al., 1997; DESCHENES et al., 1996). In Deutschland war ein HUS-Fall nachweislich auf den Verzehr von Rohmilch zurückzuführen (BOCKEMÜHL et al., 1990). 1995 traten in der Tschechischen Republik 4 HUS-Fälle auf, die vermutlich auf den Verzehr von unpasteurisierter Ziegenmilch zurückzuführen waren (BIELASZEWSKA et al., 1997). Zwischen 1973 und 1992 wurden in den USA 32 Ausbrüchen von EHEC-Infektionen registriert, die durch den Verzehr von kontaminiertem Käse verursacht wurden. 11 von diesen wurden durch Fehler in der Käseverarbeitung, wie Verwendung roher oder unvollständig pasteurisierter Milch oder Kontamination nach der Pasteurisation, verursacht (ALTEKRUSE et al., 1998).

In Trinkwasser können *E. coli* O157:H7 sogar über 300 Tage überleben, abhängig von der Sorte des Wasser (Quell-, Mineral-, Leistungs- oder destilliertes Wasser) (WARBURTON et al., 1998).

Viele andere Lebensmittel können ebenfalls als Kontaminationsquelle eine Rolle spielen, wie Kuchen, Nudelsalat oder Tacos (CDC, 1999; CDC, 2000 und CDC, 2001), wenn grundlegende Hygienemaßnahmen mißachtet wurden.

Aufgrund des zum Teil sehr verbreiteten Auftretens von VTEC bei den verschiedenen Tierarten ist in vielen Studien das Vorkommen von VTEC bei Lebensmitteln tierischer Herkunft untersucht worden.

Die Tabellen 2-5, 2-6 und 2-7 zeigen die Isolationsraten von VTEC in verschiedenen Lebensmitteln tierischer Herkunft aus mehreren Ländern.

Tabelle 2-5: Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Europa)

Land	Jahr	Lebensmittel	Anzahl	Positive Probe (%)		Quelle
				O157	non-O157	
Frankreich	?	Hackfleisch (R ¹)	3.450	4 (0,1) ²	n.u. ³	VERNOZY-ROZAND et al, 2002
	1997-1998	Rindfleisch	411	0	16 (4,0)	PRADEL et al., 2000
		Käse	603	0	5 (1,0)	
	?	Schweineschlachttierkörper	546	140 (26,0) ⁴		BOUVET et al., 2002
		Schweinefleisch	1.600	188 (12,0) ⁴		
Großbritannien	1998	Rinderschlachttierkörper	1.500	21 (1,4)	n.u.	CHAPMAN et al., 2001
		Schafschlachttierkörper	1.500	10 (0,7)	n.u.	
	1997-1998	Rindfleisch	3.112	13 (0,4)	n.u.	
		Schafffleisch	1.144	9 (0,8)	n.u.	
		Rind- und Schafffleisch	725	1 (0,1)	n.u.	

Fortsetzung Tabelle 2-5:

Land	Jahr	Lebensmittel	Anzahl	Positive Probe (%)		Quelle
				O157	non-O157	
Großbritannien	1997-1998	Rindfleisch	1.190	2 (0,2)	n.u.	COIA et al., 2001
		Rohmilch	500	0	n.u.	
		Rohmilchkäse	739	0	n.u.	
Italien	?	Ziegenrohmilch (für Käsevorbereitung)	60	1 (1,7) ⁵	?	FOSCHINO et al., 2002
Niederlande	1996-1997	Hackfleisch (R)	571	6 (1,1)	n.u.	HEUVELINK et al., 1999b
		Hackfleisch (R, S ⁶)	402	2 (0,5)	n.u.	
		Hackfleisch (S)	76	1 (1,3)	n.u.	
		Schweinfleischerzeugnisse	393	1 (0,3)	n.u.	
		Fleisch („ready-to-eat“)	328	1 (0,3)	n.u.	
Schweiz	?	Hackfleisch (R)	211	0	5 (2,3)	FANTELLI und STEPHAN, 2001
		Hackfleisch (S)	189	0	2 (1,0)	

¹ Rinder. ² O157:H7 ³ nicht untersucht
⁵ O157:H7, jedoch ohne VT-Nachweis

⁴ VTEC-Nachweis nur mittels PCR für *vtx* (nicht mittels Isolierung von VTEC), meist *vtx2e*-
⁶ Schwein

Tabelle 2-6: Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (außerhalb Europa)

Land	Jahr	Lebensmittel	Anzahl	Positive Probe (%)		Quelle
				O157	non-O157	
Argentinien	2000	Hackfleisch (R ¹)	160	6 (3,8)	n.u. ²	CHINEN et al., 2001
		frische Wurst	83	4 (4,8)	n.u.	
		Rohwurst	30	1 (3,3)	n.u.	
Brasilien	?	Hackfleisch (R)	105	0	20 (19,1)	CERQUEIRA et al., 1997
USA	?	Rindfleisch	60	0	14 (23,0) ³	SAMADPOUR et al., 1994
		Kalbfleisch	8	0	5 (63,0) ³	
		Schweinefleisch	51	0	9 (18,0) ³	
		Lammfleisch	21	0	10 (48,0) ³	
		Geflügel	48	0	5 (10,4) ³	
		Fisch	106	0	8 (7,5) ³	
	2000-2001	Rohmilch (R)	268	2 (0,8)	n.u.	MURINDA et al., 2002

¹ Rinder² nicht untersucht³ VTEC-Nachweis nur mittels Hybridisierung mit *vtx1*- und *vtx2*-Sonde (nicht mittels Isolierung von VTEC)

Tabelle 2-7: Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Bundesrepublik Deutschland)

Jahr	Lebensmittel	Anzahl	Positive Probe (%)		Quelle
			O157	non-O157	
1995-1997	Rohmilch	139	4 (2,9)		RICHTER et al., 1998
?	Vorzugsmilch	174	4 (2,3)		
?	Hackfleisch (R)	138	0	17 (12,3)	
1997-1998	Rohwurst (R)	168	0	14 (8,3)	
?	Schweinefleisch	307	1 (0,3)	0	BÜLTE, 2001
	Rindfleisch	1.381	3 (0,3)	92 (6,7)	
	Rindfleisch * („patties“)	454	2 (0,4)	n.u. ²	
	Schafffleisch	267	0	14 (5,2)	BÜLTE, 2002
	Schafschlacht tierkörper	87	0	63 (72,4)	
		Rindfleischerzeugnisse	463	5 (1,1)	

¹ Rinder² nicht untersucht

* nur auf O157 untersucht

In einer Studie von 1991 bis 1996 konnten PIÉRARD et al. (1997) VTEC aus Lebensmitteln von verschiedenen Wildtieren wie Rot-, Dam- und Rehwild, Rentier, Antilope, Wildkaninchen und –schwein sowie Vögeln isolieren.

Bei der Rohwurstreifung können *E. coli* O157:H7 sowie andere EHEC mehrere Tage bis hin zu mehreren Wochen überleben (POZZI et al., 1996). RICHTER et al. (1998) konnten aus 168 rindfleischhaltigen Rohwürsten in 14 Proben (8,3 %) VTEC nachweisen. Dabei handelte es sich um kurzgereifte, streichfähige Mett- und Teewürste.

Auffällig ist auch der hohe Anteil an *E. coli* O157:H7 von 36,0 % aus Rindfleisch, untersucht in Malaysia. Allerdings wurden hierbei nur 25 Proben untersucht (RADU et al., 1998). SAMADPOUR et al. (1994) erzielten zum Teil sehr hohe VTEC-Nachweisraten von 5,0 bis 63 % in Rindfleisch, Schweinefleisch, Hirschfleisch, Schafffleisch, Geflügel und Fisch.

Nach dem O111-Ausbruch in Australien konnten von PATON et al. (1996) einige interessante Beobachtungen gemacht werden. Neben drei verschiedenen *E. coli* O111:H⁻-Genotypen konnten aus Stuhlproben von Patienten weitere EHEC-Stämme isoliert werden, die zu sieben verschiedenen Serogruppen (O26, O91, O111, O123, O128, O157 und O160) gehörten. Im Gegensatz zu den O111-Stämmen waren diese bis auf die O26- und O157-Stämme *eae*-Gen-negativ. In der als Vektor implizierten Mettwurst konnten neben O111:H⁻ mindestens sieben weitere Serogruppen bestimmt werden. Sowohl beim Menschen als auch in der Mettwurst traten nur der Serotyp O111:H⁻ und die Serogruppe O91 gleichzeitig auf. Dabei vermutete die Arbeitsgruppe, dass in der Mettwurst nur etwa eine *E. coli* O111:H⁻-Zelle pro 10 g vorhanden war. In einer späteren Veröffentlichung konnten PATON et al. (1997) bei Untersuchungen verschiedener Stämme, die von HUS-Patienten und aus der implizierten Mettwurst isoliert worden waren, eine Korrelation zwischen der Adhärenz gegenüber Henle 407-Zellen *in vitro* und der Eigenschaft, eine schwere Erkrankung auszulösen, feststellen. Die Adhärenz der humanen Isolate war signifikant größer als die der Isolate, die ausschließlich im Lebensmittel nachgewiesen wurden. Sie zogen daher die Schlussfolgerung, dass dieses Phänomen als Marker zur Einschätzung des Virulenzpotentials von VTEC-Stämmen eingesetzt werden könnte.

Australische und neuseeländische Lebensmittelbehörden haben nach diesem Infektionsgeschehen obligate Forderungen an die Lebensmittelindustrie gestellt, um weiteren Ausbrüchen vorzubeugen. Beispielsweise muss ein Monitoring und eine Dokumentation von *E. coli*-Gehalten, von pH-Werten und von Temperaturen bei Reifungsprozessen erfolgen (DESMARCHELIER, 1997).

2.2.2.10 Andere Übertragungswege

Neben der Übertragung von EHEC über Lebensmittel und Wasser gibt es weitere Übertragungsmöglichkeiten.

Tier – Mensch:

Vereinzelte Fälle wurden berichtet, wo ein direkter Tierkontakt als Übertragungsweg vermutet oder bestätigt wurde (HEUVELINK et al., 2002; CHALMERS et al., 1997; siehe [Abschnitt 2.2.2.8](#)). Der direkte Kontakt mit Wiederkäuern und ihren Fäzes im Tierhaltungsbereich in Deutschland stellte eine der Hauptinfektionsquellen für den Menschen dar (HUBER et al., 1998). BEUTIN et al. (2000) konnten beweisen, dass der Übertragungsweg bei vier an Durchfall erkrankten Kindern der direkte Kontakt mit *E. coli* O118-infizierten Rindern war. Im Jahre 2000 wurde in den USA bei vier (6 %) EHEC-Ausbrüchen Tierkontakt als Übertragungsweg vermutet oder bestätigt (CDC, 2001).

Tier-Tier:

Prävalenzstudien von Rinderherden zeigen, dass VTEC auch von Tier zu Tier übertragen werden. GANNON et al. (2002) konnten beweisen, dass frischmelkende Kühe *E. coli* O157:H7 über den Kot ausscheiden und dies eine mögliche Infektionsquelle der Kälbern darstellt.

Mensch – Mensch:

SPIKA et al. (1986) berichtete von einer *E. coli* O157:H7-Infektion, bei der insgesamt 36 Kinder einer Tagesbetreuungsstätte ("day care center") erkrankten (25 mit

Diarrhöe, 11 mit HC), drei Kinder entwickelten ein HUS. Zum ersten Mal wurde in einem größeren Ausbruch kein Lebensmittel, sondern der Mensch als Überträger dieser pathogenen Erreger vermutet. Bei einem *E. coli* O157:H7-Ausbruch in einer Kindertagesstätte im Jahr 1994 erkrankten 36 von 107 Kindern an Diarrhöe, wobei 11 blutige Diarrhöen entwickelten. Der größte Anteil an Erkrankten trat in den Gruppen der bis drei Jahre alten Kinder auf. Auch zwei der 15 Erzieher (15 %) fielen unter die Faldefinition. Ursache waren auch in diesem Fall wahrscheinlich eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung (REIDA et al., 1994). In den Jahren 1998, 1999 und 2000 wurden in den USA sechs (14 %), sieben (18 %) bzw. drei (8 %) EHEC-Ausbrüche durch „person to person“-Kontakt in „day care centers“ verursacht (CDC, 1999; CDC, 2000 und CDC, 2001). "Person to person"-Infektionen spielen eine bedeutsame Rolle sowohl bei ursächlichen Ausbrüchen als auch bei der Weiterverbreitung nach Ausbruch eines Infektionsgeschehens. Hier ist vor allem die Problematik von symptomlosen Trägern anzuführen.

2.2.2.11 Typisierung von *E. coli* O157

Um epidemiologische Zusammenhänge aufklären zu können, sind verschiedene phäno- und genotypische Verfahren verfügbar.

2.2.2.11.1 Methoden zur Phänotypisierung

Die Phänotypisierungsschemata beinhalten biochemische Methoden, welche fermentative Eigenschaften von *E. coli* als Charakterisierungsparameter nutzen (ALEKSIC et al., 1992). SZABO et al. (1986) haben den **HC (Hämorrhagische Colitis)-Agar** entwickelt, welcher die beiden Eigenschaften Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht (366 nm) durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG) und Abbau von Sorbit nachweist. Nahezu alle O157:H7-EHEC sind Sorbit- und MUG-negativ (DOYLE und SCHOENI, 1984; HOCKIN et al., 1983; FENG, 1995). Bei den O157:H⁻-VTEC sind ca. 47,0% Sorbit- und MUG-positiv (GUNZER et al., 1992). Andere entwickelte Phänotypisierungsmethoden sind die **Phagentypisierung** oder **Lysotypie** (AHMED et al., 1987), der Nachweis von Allelvariationen in genomischen polymorphen Enzymloci durch Multilocusenzymelektropherese (**MEE**) (WHITTAM et al., 1993 und WHITTAM, 1998), **VT-Phänotypisierung**, z. B. mittels

Zytotoxizitätstest (KARMALI et al, 1983), die **Serotypisierung** (BRÜCKLER et al., 1991) und die **Antibiotikaresistenztestung**.

Die **Bestimmung von Antibiotikaresistenzen** wurde in den letzten Jahren häufig durchgeführt und konnte gelegentlich im Hinblick auf eine epidemiologische Markerfunktion hilfreich sein (KIM et al, 1994; GALLAND et al, 2001; GEONARAS et al., 2001). Antibiotikaresistenzen sind bei *E. coli* O157:H7-Stämmen weit verbreitet und scheinen in den letzten Jahren zugenommen zu haben (THOMAS et al., 1996). In einer Untersuchung mit VTEC-Stämmen konnten KLEIN und BÜLTE (2003) zeigen, dass sich alle untersuchten Stämme als empfindlich gegenüber Quinolonen, Gentamicin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Nitrofurantoin erwiesen. Einige Stämme zeigen Resistenz gegen Cefalothin (darunter ein O157:H7-Stamm), Tetracyclin und Cefazolin. Es wurde keine Mehrfach-Resistenz beobachtet.

Die **Lysotypie** basiert auf dem Prinzip, dass Bakteriophagen durch strenge Wirtsspezifität und mit einer hohen Reproduzierbarkeit definierte Wirtszellen infizieren und somit in Kultur zur Lyse bringen. Durch den Einsatz verschiedener definierter Bakteriophagen kann eine Differenzierung der Isolate vorgenommen werden. 82 Phagen-Typen sind bislang bekannt; diese Typisierungsmethode wird in Kanada, den USA, Japan, Australien, England und Wales, Schottland, Deutschland und in anderen europäischen Ländern eingesetzt (STROCKBINE et al., 1998; LIESEGANG et al., 2000). Der größte Nachteil der Phagentypisierung ist das Vorkommen von gemeinsamen Phagen-Typen. 45,9 % aller *E. coli* O157:H7, die vom "Laboratory of Enteric Pathogens" im Vereinigten Königreich zwischen 1992 und 1994 isoliert wurden, gehören dem Phagen-Typ 2 an; 84 % dieser Isolate sind fünf Phagen-Typen zugeordnet (THOMAS et al., 1996). KRAUSE et al. (1996) zeigten auch, dass die Phagen-Typisierung nicht immer zuverlässig ist und daher als zusätzliche Information gewertet werden sollte. Andererseits haben HEUVELINK et al. (1998a) gezeigt, dass trotz des eigentlich besseren Auflösungsvermögens der PFGE mittels Phagen-Typisierung Stämme unterschieden werden konnten, die identische *Xba*I-Muster bei der PFGE gezeigt hatten. Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch andere Autoren (PRESTON et al., 2000).

Die Differenzierung von Verotoxin-Varianten bzw. -Subtypen stellte sehr frühzeitig eine schnelle und einfach durchzuführende Methode zur ersten Charakterisierung von VTEC-Isolaten dar. Während die VT-Neutralisation im Verozelltest (**Zytotoxizitätstest**) relativ aufwendig ist, kann diese Subtypisierung in Routinelaboratorien mit verschiedenen immunologischen Methoden wie **ELISA**, **Immunoblot** oder **VTEC-RPLA** (Latex-Agglutinationstest für Nachweis von VT) durchgeführt werden. Sie kann gemeinsam mit anderen Differenzierungsmethoden wichtige zusätzliche Informationen liefern (STROCKBINE et al., 1998). Limitiert ist ihr Einsatz als alleinige Technik zur Subtypisierung allerdings durch den Nachweis von drei möglichen VT-Phänotypen, nämlich VT1, VT2 oder die gleichzeitige Exprimierung von VT1 und VT2. Der Nachweis der einzelnen Verotoxine gibt im Rahmen epidemiologischer Studien Aufschluss über die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen VT-Genotypen und lässt eine mögliche Risikoabschätzung für den Verbraucher zu (BOCKEMÜHL et al., 1998).

Die Subtypisierung der VT1- (VT1 und VT1c) und der VT2-Gruppe (VT2, VT2c, VT2e, VT2d und VT2f) kann ein sehr brauchbarer Marker sein (WILLSHAW et al., 1997); jedoch ist hierfür nach derzeitigem Stand der Technik der Einsatz molekularbiologischer Methoden notwendig.

2.2.2.11.2 Methoden zur Genotypisierung

Für eine Genotypisierung wurden vielfältige Methoden entwickelt, u. a. die **Plasmidtypisierung** (WELLS et al, 1983), **Ribotyping**, **Pulsfeldgelelektrophorese** (Pulsed Field Gel Electrophoresis, **PFGE**), **eae-Gen Nachweis** und Subtypisierung durch **Polymerase-Kettenreaktion** („Polymerase Chain Reaction“, **PCR**) (siehe Abschnitt 2.2.2.2), **EHEC-hly Nachweis** durch PCR (siehe Abschnitt 2.2.2.2) und die **Verotoxintypisierung**.

Die **Verotoxintypisierung** kann entweder durch Gen-Sonden oder auch mittels PCR (Tabelle 2-8) vorgenommen werden. Der erste Schritt zur Genotypisierung wurde durch die Möglichkeit geschaffen, VT1 und VT2 mittels DNA-Sonden zu unterscheiden (KARCH UND MEYER, 1989a). In der Folge wurden auch verschiedene PCR-Methoden zum Nachweis von unterschiedlichen VT-Genen entwickelt. Zur

Subtypisierung der VT2-Varianten kommen spezifische Primer zum Einsatz, wie bei VT2c, VT2d, VT2e und VT2f (PIÉRARD et al., 1998; POLLARD et al., 1990 und RÜSSMANN et al., 1995). Teilweise muss anschließend ein Restriktionsverdau des Amplifikates vorgenommen werden. Diese Art des Nachweises wird auch als PCR-RFLP bezeichnet. Um eine weitere Differenzierung von VT2c und VT2d vornehmen zu können, muss vergleichbar wie für den Nachweis von VT2c nach der Amplifikation ein Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen vorgenommen werden. Durch den Verdau des Amplifikates mit *HaeIII* und *PvuII* kann VT2d in VT2d-Ount und VT2d-OX3a differenziert werden. Der Nachweis des VT2d-O111 erscheint derzeit nur durch Sequenzierung des Gens möglich (PIÉRARD et al., 1998).

Tabelle 2-8: Primer zur Verotoxintypisierung bei *E. coli*-Stämme

VT-Subtyp	Primer Akronym	Primersequenz (5'-3')	Referenz
VT1	VT1A	GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG	POLLARD et al., 1990
	VT1B	AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA	
VT1	LP30	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	CEBULA et al., 1995
	LP31	2.2.2.11.2.1 CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG	
VT1	KS7	CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC	RÜSSMANN et al., 1995
	KS8	CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG	
VT1c	Stx1c-1	TTT TCA CAT GTT ACC TTT CCT	ZHANG et al., 2002
	Stx1c-2	CAT AGA AGG AAA CTC ATT AGG	
VT2	LP43	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	CEBULA et al., 1995
	LP44	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	
VT2/VT2c	GK3	ATG AAG AAG ATG TTT ATG	KARCH et al., 1997
	GK4	TCA GTC ATT ATT AAA CTG	
VT2d	VT2d-AM-I	AGG GCC CAC TCT TTA AAT ACA TCC	ABDULMAWJOOD und BÜLTE, 2000
	VT2d-AM-II	CGT CAT TCC TGT TAA CTG TGC G	
VT2e	FK1	CCC GGA TCC AAG AAG ATG TTT ATA G	RÜSSMANN et al., 1995
	FK2	CCC GAA TTC TCA GTT AAA CTT CAC C	
VT2f	128-1	AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG	SCHMIDT et al., 2000
	128-2	TAC TTT AAT GGC CGC CCT GTC TCC	

Die Einsatzfähigkeit der Verotoxintypisierung als alleinige Typisierungsmethode ist allerdings durch die begrenzte Anzahl von möglichen Typen, kombiniert mit der Prävalenz von einem einzigen Toxintyp in einem geographischen Gebiet, limitiert. (STROCKBINE et al. 1998). Trotzdem ist die VT-Typisierung zusammen mit anderen Typisierungsmethoden nützlich. Die Präsenz von VT2-Varianten kann dabei von Nutzen sein (WILLSHAW et al., 1997).

Das DNA-Fingerprinting mit der **Pulsfeldgelelektrophorese (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)**, ein Verfahren, das von SCHWARTZ und CANTOR (1984) entwickelt wurde, beruht auf der Spaltung der chromosomalen DNA durch sog. „selten schneidende“ Restriktionsendonukleasen und der Auftrennung der entstandenen Fragmente im elektrischen Wechselfeld. Dabei ergeben sich definierte, stammspezifische Bandenmuster („Fingerprints“). Der Vergleich von Fragmentlängenmustern verschiedener Isolate ermöglicht die Identifizierung verwandter Stämme und die Bestimmung des klonalen Ursprungs einer Spezies.

Bei der herkömmlichen Elektrophorese von DNA-Fragmenten (im statischen elektrischen Feld) können nur Stücke bis zu einer Größe von etwa 50 kb getrennt werden. Größere Fragmente wandern nur noch wenig und ohne Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Molekülgröße. Mit der PFGE ist es möglich, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von etwa 2.000 kb zu trennen. Das elektrische Feld wechselt seine Richtung in festgelegten Zeitintervallen („Pulszeiten“).

Wird ein elektrisches Feld an ein Gel angelegt, so strecken sich die DNA-Moleküle in Richtung des Feldes und durchwandern das Gel. Verschwindet das erste elektrische Feld und wird ein zweites Feld (in einem bestimmten Winkel zum ersten Feld) aktiviert, muss das DNA-Knäuel seine Konformation ändern um sich zu reorientieren, bevor es in die Richtung des zweiten elektrischen Feldes migrieren kann. Es wurde herausgefunden, dass die Zeit, die für diese Reorientierung benötigt wird, sehr sensitiv im Hinblick auf das Molekulargewicht ist. Größere DNA-Moleküle brauchen mehr Zeit als kleinere Moleküle, um sich zu reorientieren, d. h. Moleküle mit zunehmender Größe benötigen längere Zeit, bevor sie mit der Migration durch das Gel beginnen.

Weiterhin wird die Konformation eines DNA-Moleküls durch einen Spannungsgradienten verändert, d. h. nach Entfernung aus dem elektrischen Feld relaxiert es zurück in seine alte Konformation.

Die **H-Antigen-Typisierung** konnte durch **PCR-RFLP** bestätigt werden (FIELDS et al. 1997). Mittels dieser Methode konnten *E. coli* O157:H7 und *E. coli* O157:H⁻ identifiziert werden. Die Ergebnisse von FIELDS et al. (1997) zeigten, dass die Verotoxin-bildenden *E. coli* O157:H7 und *E. coli* O157:H⁻ identische RFLP aufweisen, d. h. VT-positive O157:H⁻-Isolate als genetische O157:H7 anzusehen sind.

Mittels **Ribotyping** konnte MARTIN et al. (1996) keinen Unterschied zwischen 85 epidemiologisch beziehungslosen Isolaten finden. Diese Methode wurde daraufhin als nicht geeignet für Typisierung von *E. coli* O157:H7-Isolaten eingestuft. Auch von GRIF et al. (1998) wurde die Ribotyping-Methode als nicht geeignet für die Erfassung epidemiologischer Zusammenhänge zwischen *E. coli* O157-Stämmen klassifiziert.

Arbitrarily primed Polymerasekettenreaktion (**AP-PCR** oder „Randomly Amplified Polymorphic DNA“-**RAPD**) konnte erfolgreich eingesetzt werden, um zwischen *E. coli* O157:H7-Stämmen zu unterscheiden (MADICO et al., 1995). Andere Autoren bescheinigen dieser Methode allerdings keine gute Reproduzierbarkeit (TYLER et al., 1997). BIELASZEWSKA et al. (1998) konnte mittels RAPD tschechische verotoxinogene *E. coli* O157-Stämme mit *E. coli* O157-Stämmen aus Deutschland vergleichen.

Eine Weiterentwicklung stellt die **RFLP** mit anschließender **Southern-Blot-Hybridisierung** dar. Bei der RFLP werden häufig-schneidende Restriktionsenzyme wie z. B. *EcoRI* zum Verdau der DNA eingesetzt, um eine höhere Auftrennung zu erlangen (Erkennungssequenz bis 4 bp). Im weiteren werden durch Southern-Blot und anschließender Hybridisierung der DNA-Fragmente mit Gensonden einzelne Fragmente sichtbar gemacht. Diese können dann Aufschluss über die Lage einzelner Gene innerhalb des Genoms geben, oder auch die Verteilung häufig vorkommender – repetitiver – Sequenzen nachweisen. Die Differenzierung mittels RFLP ist also eine Form der Genkartierung, bei der die eingesetzte Gensonde je nach Homologie zu selten oder häufiger im Bakteriengenom vorkommenden Sequenzen mit einem oder mehreren Restriktionsfragmenten aus dem Verdau hybridisiert. Im Idealfall entstehen

unterschiedliche Muster, die eine Differenzierung bzw. Zuordnung der einzelnen Isolate in epidemiologische oder genetische Gruppen erlauben. SAMADPOUR et al. (1993) konnte *E. coli* O157:H7 erfolgreich mittels Hybridisierung von geschnittener DNA mit einer λ -Bakteriophagen-Sonde typisieren. Später wurde die RFLP mit *vtx1*-, *vtx2*-, *vtx2c*- und *p*-Gen als Sonde durchgeführt (SAMADPOUR et al., 1994; DATZ et al. 1996).

DATZ et al. (1996) setzten das λ -Bakteriophagen-spezifische ***p*-Gen** als Sonde ein, um die Häufigkeit bzw. die Verteilung von λ -Bakteriophagen-Genomen in EHEC zu ermitteln. Sie konnten in dieser Untersuchung nachweisen, dass das *p*-Gen mit dem *vtx1*- oder *vtx2*-Gen vergesellschaftet war. Sie wiesen durch die RFLP zudem unterschiedliche Restriktionsmuster nach, die sich in der Folge als brauchbare Methode zur Feintypisierung im Rahmen der epidemiologischen Surveillance erwiesen (ALLERBERGER et al., 2000; LIESEGANG et al., 2000)

„Fluorescent amplified-fragment length polymorphism“ (**FAFLP**) wurde ebenfalls für die Genotypisierung von *E. coli* O157 eingesetzt. Diese Methode zeigte widersprüchliche Ergebnisse. Einige Autoren (SMITH et al., 2000) behaupten, dass sie genau so gut geeignet sei wie die PFGE, andere (HEIR et al., 2000) bescheinigen der PFGE hat eine höhere „discrimintory power“ als der FAFLP; ihrer Meinung nach sollte die PFGE die Methode der Wahl für epidemiologische Untersuchungen bleiben.

Neuerdings haben KUDVA et al. (2002) eine neue Methode, die „Polymorphic Amplified Typing Sequences“ (**PATS**) zur *E. coli* O157:H7-Typisierung entwickelt. Diese Methode basiert auf der Präsenz von diskreter Deletion und Insertion in *E. coli* O157-DNA, die verantwortlich für die Unterschiede in *Xba*I-PFGE-Mustern sind. Dabei wurden für die Amplifizierung der flankierenden genomischen DNA-Abschnitte aller 40 individuellen *Xba*I-Schnittstellen von zwei *E. coli* O157-Referenzstämmen Primer entwickelt. PATS hat sich als weniger empfindlich als die PFGE erwiesen. Trotzdem sollte in weiterer Forschungsarbeit ihre Nützlichkeit für epidemiologische Untersuchungen weitergehend untersucht werden.

Insbesondere für epidemiologische Fragenstellungen scheint die Plasmidtypisierung-Methode nicht so gut geeignet zu sein wie die „ λ RFLP“ (PAROS et al., 1993) und die PFGE (MENG et al., 1995).

Nach STROCKBINE et al. (1998) ist die Kombination von Phagentypisierung, Verotoxintypisierung und PFGE zusammen die beste Lösung für eine maximale Stamm-Diskriminierung.

Nach TENOVER et al. (1995) ist die Kombination von klassischer Erregertypisierung und dem „genetischen Fingerabdruck“ gut geeignet, um die klonale Identität von EHEC-Isolaten bei Ausbrüchen und Umgebungsuntersuchungen zu überprüfen.

Nach GRIF et al. (1998) ist die PFGE von *Xba*I-geschnittener DNA die zu bevorzugende Subtypisierungsmethode. Diese Autoren sind der Meinung, dass bedeutende Unterschiede zwischen den Ergebnissen vieler Subtypisierungsmethoden, wie Ribotyping, Phagentypisierung, AP-PCR und PFGE, gefunden werden konnten. Die Klassifizierung von *E. coli* O157-Isolaten als „epidemiologisch verwandt“ bzw. „nicht-verwandt“ sollte aber insgesamt nicht auf der Durchführung einer einzigen Methode beschränkt bleiben.

Mit der Verotoxintypisierung konnten Stämme unterschieden werden, die sich mit anderen Methoden als identisch dargestellt hatten; damit konnte die Bedeutung dieses Verfahrens demonstriert werden. Mittels PFGE, Phagentypisierung und *p*-Gentypisierung konnte ALLERBERGER et al. (2000) fünf VT-negative *E. coli* O157-Isolate nicht vom VT2-positiven „bayrischen Ausbruchsstamm“ unterscheiden.

Auch von TENOVER et al. (1995) wurden Kriterien zur Interpretation von PFGE-Mustern bei der Untersuchung von Ausbrüchen aufgestellt. Hiernach liegt bei einer völligen Übereinstimmung der Bandenmuster eine gesicherte Verwandtschaft zwischen den Isolaten (identischer Klon) vor, das heißt die Isolate stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einem Ausbruchsgeschehen. Bei nur geringen Abweichungen (2-3 Banden Unterschiede) ist die enge Verwandtschaft der Isolate ebenfalls wahrscheinlich. Abweichungen von sieben und mehr Banden lassen auf

Erreger schließen, die mit hoher Sicherheit nicht aus einem gemeinsamen Ausbruchsgeschehen stammen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde **Verotoxintypisierung**, **RFLP** mit **p-Gen** als Sonde und **PFGE** als Genotypisierungsschemata benutzt. Diese Methoden werden in den Abschnitten 3.8 bis 3.10 beschrieben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Anzahl und Herkunft der untersuchten *Escherichia coli* O157 – Stämme

3.1.1 Laborstämme

- *E. coli* C600
- *E. coli* C600 H19J (Transduktant des Stammes C600 mit dem VT1 Phagen H19)
- *E. coli* C600 W34 (Transduktant des Stammes C600 mit dem VT2 Phagen W34)
- *E. coli* NCTC 12900 (*E. coli* O157:H7 Stamm, ohne *vtx*-Gene) (SKANDAMIS und NYCHAS, 2000)

3.1.2 Wildstämme

Die Stämme (n = 174) wurden aus Stuhl (n = 82), Lebensmitteln (n = 41), Rinderkot (n = 42), Pferdekot (n = 6), Kälberkot (n = 2) und Hundekot (n = 1) isoliert und stammen aus verschiedenen Instituten und Regionen. In der Anhangstabelle 10-1, 10-2, 10-3 und 10-4 sind diese weitergehend charakterisiert.

3.2 Nährmedien und Supplemente

Folgenden Nährmedien wurden eingesetzt :

- Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon = CASO-Bouillon (FA. MERCK 1.05459)
- Brain heart infusion broth (Hirn-Herz-Bouillon) = BHI (FA. MERCK 1.10493)
- Plate-Count-Agar = PC-Agar (FA. MERCK 1.05463)
- Hämorrhagische Colitis-Medium = HC-Agar nach SZABO (FA. SIFIN TN 1223)

3.3 Material und Laborgeräte

Genutzt wurden:

- MICROBANK™ (FA. BECTON-DICKINSON 4354862)
- Pipetten (Reference der FA. EPPENDORF 100-1.000 µl, 50-200 µl, 10–100 µl, 0,5–10 µl und 0,1–2,5 µl)
- Auslaufmesspipetten nach DIN 12696, Genauigkeit Klasse B und AS
- Kulturröhrchen nach DIN 12395 mit Verschlusskappe aus Aluminium
- Messzylinder aus Glas nach DIN 12680, Genauigkeit Klasse B
- Messkolben aus Glas nach DIN 12664, Genauigkeit Klasse A
- Ständer für Kulturröhrchen
- Pipettenspitzen (FA. EPPENDORF, Volumina 10 µl, 200 µl und 1.000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filter (FA. NERBE PLUS, Volumina 10 µl)
- Spitze Pinzette
- Trocknungsschrank (40 °C)
- Brutschrank (37 °C)
- Reagenzglas-Schüttelgerät (IKA-VIBRO-FIX VF2, FA. IKA® LABORTECHNIK)
- Pipettierhilfen (Peleusball)
- Einwegpetrischalen gemäß DIN 58940
- Kühlschrank (+2-4 °C)
- Gefriertruhe (-25 °C)
- Platinösen
- Bunsenbrenner (Gasi, Typ 3.340 102, FA. SCHÜTT LABORTECHNIK)
- Feinwaage (Satorius Typ E 5500 S, FA. SARTORIUS)
- Einmahlhandschuhe
- Kühlbox
- pH-Meter (Mikroprozessor-pH-Meter 539, FA. WTW)
- UV-Kabinett (825-UCV/22, FA. PLAS-LABS)
- Reagenzgefäße (Multi SafeSeal Tubes, 1,7 ml, FA. PEQLAB)

- Reagenzgefäße (Safe-Seal Reagiergef., 2 ml, FA. SARSTEDT)
- Reagenzgefäße für PCR
- Schüttelwasserbad (Typ 1083, Fa. GFL[®])
- Sicherheitswerkbank (LaminAir[®] HB 2448, FA. HERAEUS INSTRUMENTS)
- Spektrophotometer (U-2000, FA. HITACHI)
- Schüttelapparat (Typ 3014, Fa. GFL[®])
- Plastikwanne, Glaswanne
- Pulsfeldgelelektrophoresegerät (CHEF-DR II „Pulsed Field Electrophoresis System" , FA. BIORAD)
- Gießkammer für PFGE (100 µl; FA. BIORAD)
- Flachbettform (13 x 14 x 0,55 mm, FA. BIORAD)
- Elektrophoresekammer (Typ Blue Marine 100 und 200, FA. BLUELINE)
- Zentrifuge (Typ 5403, FA. EPPENDORF)
- Kühlzentrifuge (Typ 5415C, FA. EPPENDORF)
- Thermocycler (TouchDownTM Temperature Cycling System, FA. HYBAID)
- Photoanlage (MP 4⁺, FA. POLAROID)
- Ultraviolet Transilluminator (Mighty Bright UVTM-25, FA. HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS)
- Ultraviolet Transilluminator (UVC 500 Crosslinker, FA. HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS)
- Hybridisierungssofen (SI 20H, FA. STUART SCIENTIFIC)
- Thermomixer (Typ 5436, FA. EPPENDORF)
- Nylon Membranen, positiv geladen (FA. ROCHE 1 209 272)
- Gel-Blotting-Papiere (426 690, FA. SCHLEICHER & SCHUELL)
- Saugfähiges Papier

3.4 Chemikalien

Genutzt wurden:

- Agarose Standard (FA. Q BIO GENE AGAH0500)
- AmpliTaq[®] DNA Polymerase mit GeneAmp[®] 10 x Puffer (15 mM MgCl₂) (FA. ROCHE N808-0152)
- Anti-Digoxigenin-AP Konjugat (FA. ROCHE 1 093 274)
- Blockierungsreagenz (FA. ROCHE 1 096 176)
- Borsäure (FA. MERCK 1.00165)
- Brij[®] 35 (FA. MERCK 801962)
- DIG Easy Hyb (FA. ROCHE 1 603 558)
- DIG-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat, Alkali-stabil, FA. ROCHE 1 093 088)
- „DNeasy Tissue“-Kit (FA. QIAGEN)
- dATP, Na-salt, PCR Grade (FA. MERCK 1 934 511)
- dCTP, Na-salt, PCR Grade (FA. MERCK 1 934 520)
- dGTP, Na-salt, PCR Grade (FA. MERCK 1 934 538)
- dTTP, Na-salt, PCR Grade (FA. MERCK 1 934 549)
- EDTA Titriplex II (FA. MERCK 1.08417)
- EDTA Titriplex III (FA. MERCK 1.12029)
- *E. coli* O157 Latex-Agglutinationstest (FA. OXOID DR 620M)
- Ethanol Absolut (FA. MERCK 1.00983)
- Ficoll (F-2878, FA. SIGMA)
- InCert[®]-Agarose (FA. BMA[®])
- Isopropanol (FA. MERCK 1.09634)
- Lysozym (FA. MERCK 1.05281)
- Maleinsäure (FA. MERCK 8.00380)
- MetaPhor[®] Agarose (FA. BMA[®] 50180)
- Natriumchlorid (FA. MERCK 1.06404)

- Natriumdodecylsulfat (SDS) (FA. SIGMA L-4509)
- Natriumlauroylsarcosin (FA. SIGMA L-5125)
- NaOH-Plättchen (FA. MERCK 1.06498)
- NBT/BCIP-Lösung (FA. ROCHE 1 681 451)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (FA. ROTH 6367.1)
- Proteinase K (FA. ROCHE 1 373 200)
- Pulsed Field Certified Agarose (FA. BIORAD, 162-0137)
- Restriktionsendonuclease *EcoRI* (FA. ROCHE 1 175 084)
- Restriktionsendonuclease *SfiI* (FA. ROCHE 1 288 024)
- Restriktionsendonuclease *XbaI* (FA. ROCHE 674 273)
- Salzsäure 25 % reinst (FA. MERCK 312)
- Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS Ultra Qualität) (FA. ROTH 5429.3)
- Trinatriumcitrat-Dihydrat (FA. MERCK 1.06448)
- Tween® 20 (FA. ROTH 9127.1)

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Puffer und Lösungen für die Polymerasekettenreaktion

dNTP-Mix 10 mM:

dATP 100 mM	10 µl
dCTP 100 mM	10 µl
dGTP 100 mM	10 µl
dTTP 100 mM	10 µl
Aqua bidest./sterilfiltriert	60 µl

3.5.2 Agarose und Puffer für die konventionelle Elektrophorese

10 X TBE-Puffer:

0,5 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

0,5 M Borsäure

10 mM EDTA Titriplex II

1,5 %iges Agarosegel:

Agarose Standard 1,35 g

1 X TBE 90 ml

Aufkochen und mit ca. 50 °C vergießen

3,0 %iges Metaphorgel:

MetaPhor® Agarose 2,7 g

1 X TBE 90 ml

Aufkochen und mit ca. 50 °C vergießen

Probenpuffer:

5 %ige Bromophenolblaulösung 0,25 ml

15 %ige Ficoll-Lösung 10 ml

Ethidiumbromid-Bad:

1,0 %ige Ethidiumbromidlösung 50 µl

Aqua bidest. 1,5 l

3.5.3 Puffer und Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese

Lysispuffer:

6 mM Tris (pH 7,6)

1 M NaCl

10 mM EDTA (pH 7,6)

0,5 % Brij[®] 35

0,2 % Natriumdodecylsulfat

0,5 % Natriumlauroylsarcosin

TE-Puffer:

10 mM Tris – HCl (pH 7,6)

1 mM EDTA

10 X TBE-Puffer:

0,5 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

0,5 M Borsäure

10 mM EDTA Titriplex II

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Lösung:

100 mM PMSF

gelöst in Isopropanol

1,5 %ige Agarose zum Einbetten der Zellen für die PFGE:

InCert-Agarose 15 mg

TE-Puffer 1 ml

Aufkochen und mit ca. 56 °C vergießen

1,1 %iges Agarosegel für die PFGE:

Pulsed Field Certified Agarose 1,32 g

0,5 X TBE-Puffer 120 ml

Aufkochen und mit ca. 50 °C in eine Flachbettform vergießen

Ethidiumbromid-Bad:

Siehe 3.5.2

3.5.4 Puffer und Lösungen für die Southern-Blot-Hybridisierung1 %iges Agarosegel:

Agarose Standard 1,2 g

1 X TBE 120 ml

Aufkochen und mit ca. 50 °C vergießen

HCl – Lösung:

250 mM HCl

Denaturierungslösung:

0,5 N NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:

0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)

3 M NaCl

20 X SSC:

3 M NaCl

300 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat (pH 7,0)

Hybridisierungslösung:

DIG Easy Hyb – gebrauchsfertige Lösung

2 X Waschlösung:

2 X SSC

0,1% SDS

0,5 X Waschlösung:

0,5 X SSC

0,1% SDS

Waschpuffer:

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

(pH 7,5)

0,3 % (v/v) Tween® 20

Maleinsäurepuffer:

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

(pH 7,5)

Blockierungslösung:

1 % (w/v) Blockierungsreagenz gelöst in Maleinsäurepuffer

Anti-Digoxigenin-AP-Lösung (150 mU/ml):

Anti-Digoxigenin-AP 12 µl

Blockierungslösung 60 ml

Detektionspuffer:

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

pH 9,5

Substratlösung:

Detektionspuffer 20 ml

NBT/BCIP-Lösung 400 µl

TE-Puffer:

10 mM Tris

1 mM EDTA

(pH 8,0)

3.6 Serotypisierung

Zum Nachweis von *Escherichia coli* Serotyp O157 wurden alle einbezogenen Stämme mittels Latex-Agglutinationstest (FA. OXOID) untersucht.

Die Bestätigung des O- und der H-Antigene der *E. coli*-Stämme erfolgte dankenswerterweise durch das Robert Koch Institut (RKI) – Berlin, durch das Hygiene Institut der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales – Amt für Gesundheit – Hamburg und durch das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) – Dessau.

3.7 Biochemische Charakterisierung auf dem HC-Agar (SZABO et al., 1986)

Die Bestimmung der β -D-Glucuronidase-Aktivität erfolgte auf dem Hämorrhagische Colitis (HC)-Medium. Durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucoronid (MUG) entsteht das fluorogene 4-methyl-umbelliferon, das unter langwelligem UV-Licht

(366 nm) nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig dient das Medium dem Nachweis der Sorbitfermentierung. Im positiven Falle erscheinen die *E. coli*-Kolonie gelb gefärbt, bei negativer Reaktion stellen sich diese als Nährbodenfarbig (bläulich-durchscheinend) dar.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die beimpften Nährböden wurden unter aeroben Bedingungen für 16-18 h bei 41 °C inkubiert.

Zusammensetzung des HC-Agars nach Szabo:

Material	(g/l)
• Pankreatisches Pepton (Casein)	20,0 g
• Sorbit	20,0 g
• Natriumchlorid	5,0 g
• Gallensalz Nr.3	1,2 g
• 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG)	0,05 g
• Bromkresolpurpur	0,015 g
• Agar	12,0 g
• Aqua dest.	ad 1.000,0 ml
pH 7,2 ± 0,2	

3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.8.1 DNA-Präparation für die PCR

Zur Präparation der bakteriellen DNA wurden die Isolate auf PC-Agar (3.2) für 24 h bei 37 °C angezüchtet. Dann wurden 4 Kolonien von der Platte direkt in 300 µl Aqua bidest. (steril filtriert) eingerieben. Diese Suspension wurde für 10 min gekocht, und nach zwei minütigem Vortexen bei 13.000 rpm für ein bis zwei Minuten zentrifugiert. Ausschließend wurden sie auf Eis abgekühlt und im Kühlschrank gelagert.

3.8.2 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR erfolgte die Erstellung eines Mastermixes mit folgender Zusammensetzung pro Reaktionsansatz:

Material	Menge
• Aqua bidest	17,4 µl
• GeneAmp® 10 x Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
• dNTP –Mix (siehe 3.5.1)	0,5 µl
• Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0 µl
• Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0 µl
• AmpliTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 22,5 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 2,5 µl vom Überstand des DNA-Präparats (3.8.1) vermischt. Nach Einsetzen der Proben in den Thermocycler konnten die in Tabelle 3-1 beschriebenen Temperaturprogramme gestartet werden.

3.8.3 Verwendete Oligonucleotid-Primer und Thermocycler–Temperaturprogramme

Die verwendeten Oligonucleotidprimer einschließlich ihrer Erstbeschreibung sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Im Thermocycler erfolgte zunächst jeweils eine initiale Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C mit anschließenden, sich unterschiedlich oft wiederholenden Zyklen zur Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisierung. Den Abschluß bildete ein Extensionszyklus für 5 min bei 72 °C, wonach die Proben bis zum Auftragen in die Gelkammer bei 4 °C aufbewahrt wurden.

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Oligonucleotidprimer

Zielgen	Primer Akronym	Primersequenz (5' - 3')	PCR-Programm	Referenz
<i>vtx</i> general A ¹⁾	MK1 MK2	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC ²⁾ CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	30 Zyklen 94 °C - 30 s, 44 °C - 30 s, 72° C - 30 s	KARCH und MEYER (1989b)
<i>vtx1</i> A und B ³⁾	VT1A VT1B	GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG ⁴⁾ AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA	30 Zyklen 94° C – 30 s, 54° C – 40 s, 72 °C – 35 s	POLLARD et al. (1990)
<i>vtx2</i> B <i>vtx2c</i> B	GK3 GK4	ATG AAG AAG ATG TTT ATG ⁴⁾ TCA GTC ATT ATT AAA CTG	30 Zyklen 94 °C - 30 s; 52° C - 60 s; 72° C - 40 s	KARCH et al. (1997)
<i>p</i> -Gen	DK1 DK2	ACA TCG CCG AGA TGG ²⁾ GCT TCC GGC ACT CGT	30 Zyklen 94° C - 30 s; 56° C - 30 s; 72° C - 30 s	DATZ et al. (1996) modifiziert ⁵⁾

¹⁾ Verotoxin, Abschnitt A

²⁾ FA. MWG BIOTECH

³⁾ Verotoxin, Abschnitt B

⁴⁾ FA. GIBCO

⁵⁾ PCR-Programm wurde verkürzt

3.8.4 Nachweis von *vtx2* und *vtx2c* durch Verdau nach der PCR

Zum Nachweis des *vtx2*- und/oder des *vtx2c*-Gens wurde das entsprechende Amplifikat nach der PCR mit den GK3- und GK4-Primern einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* unterzogen (RÜSSMANN et al., 1994).

Verdau mit dem Restriktionsenzym *HaeIII*, über Nacht bei 37° C

Material	Menge
• GK3/GK4 PCR-Amplifikat (270 bp)	10 µl
• SuRE/Cut Puffer M	2,5 µl
• <i>HaeIII</i>	0,5 µl
• Aqua dest.	12 µl

3.8.5 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der Amplifikate erfolgte mittels eines 1,5 %igen Agarosegels (3.5.2) (mit Ausnahme des *vtx2*- und *vtx2c*-Nachweises nach Verdau mit *HaeIII*, der in einem 3,0 %igen Metaphorgel erfolgte). Je 8 µl des PCR-Produktes (oder 25 µl des Verdau-Produktes) wurden mit 2 µl (oder 6,25 µl) Probenpuffer (3.5.2) vermischt und in das erstarrte Agarosegel pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Horizontalgel für 2,5 h bei 120 mA, wobei als Laufpuffer ebenfalls 1 X TBE-Puffer (3.5.2) diente. Eine Bestimmung der Größe der PCR-Produkte ermöglichte ein ebenfalls in das Gel aufgetragener DNA-Längenstandard XIV (FA. ROCHE 1 721 933), der aus 15 Fragmenten - 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500 und einem zusätzlichen Fragment von 2.642 bp – besteht; alternativ wurde der DNA-Längenstandard VI eingesetzt (FA. ROCHE 1 062 590), der ebenfalls aus 15 Fragmenten – 154, 154, 220, 234, 234, 298, 298, 394, 453, 517, 653, 1.033, 1.230, 1.766 und 2.176 bp – besteht.

3.8.6 Ethidiumbromidfärbung

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der DNA-Fragmente durch Färbung des Gels für 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung ([3.5.2](#)), wobei sich das fluoreszierende Ethidiumbromid als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA einlagerte. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch 30 minütiges Schwenken in Aqua bidest. bei Raumtemperatur entfernt.

3.8.7 Photographische Darstellung und Dokumentation

Die Auswertung und photographische Dokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht, wobei sich die DNA-Fragmente als helle Banden vor dunklem Hintergrund darstellten.

3.9 Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Erstellung eines „DNA-Fingerprints“ erfolgte eine Präparation der gesamten bakteriellen DNA, der Restriktionsverdau und eine anschließende Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeldgelelektrophorese.

3.9.1 Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

Die Präparation und der anschließende Restriktionsverdau wurden nach einer modifizierten Methode von MIRANDA et al. (1991) durchgeführt.

3.9.1.1 Einbettung der Zellen in Agaroseblöckchen

Nach Anzüchtung der zu untersuchenden Kulturen in CASO-Bouillon ([3.2](#)), anschließendem Abzentrifugieren für 10 min bei 10.000 x g bei 4 °C und Waschen in TE-Puffer erfolgte ein Resuspendieren der Bakterien in TE-Puffer und ein photometrisches Einstellen bei 620 nm auf 5 % Transmission.

Danach wurde die Bakteriensuspension mit 1,5 %iger „low melting, low gelling“ InCert-Agarose bei 55 °C im gleichen Verhältnis gemischt, in eine Gießkammer pipettiert und zum Erstarren für 10 min bei 4 °C inkubiert. Durch das Erstarren der Agarose in der Gießform entstehen kleine Blöckchen, in denen die noch intakten Zellen gleichmäßig verteilt sind.

3.9.1.2 Lyse der eingebetteten *E. coli*-Zellen und Deproteinisierung

Die Blöckchen wurden nach dem Erstarren in 200 µl Lysispuffer unter Zusatz von 5 mg/ml Lysozym über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zufügen von Proteinase K (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zur Deproteinisierung folgte eine Inkubation bei 56 °C im Wasserbad über Nacht. Die Agaroseblöckchen wurden anschließend gewaschen (2 x 30 min in 200 µl TE-Puffer/Blöckchen, inkubiert bei Raumtemperatur) sowie zur Inaktivierung der Proteinase K zweimal mit TE-Puffer unter Zugabe von 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Lösung (100 mM) für 1 h bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl TE-Puffer pro Blöckchen und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min konnte die präparierte DNA mit Restriktionsenzymen verdaut werden.

3.9.1.3 Verdau der *E. coli*-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um bei der PFGE keine zu kleinen DNA-Fragmente zu erhalten, verwendet man zum enzymatischen Schneiden im allgemeinen sogenannte „rare cutters“. Dabei handelt es sich um Restriktionsendonukleasen, die eine Abfolge von sechs, acht oder mehr definierten Nukleinbasen erkennen und dort gezielt die DNA spalten. Je länger die Erkennungssequenz, desto geringer ist die statistisch wahrscheinliche Häufigkeit für ihr Auftreten, und desto seltener schneidet das Enzym. Die daraus resultierenden DNA-Fragmente werden folglich größer.

Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Verdau mit dem Restriktionsenzym *Xba*I, über Nacht bei 37 °C

Material	Menge
• DNA (1 Blöckchen)	1 µg
• SuRE/Cut Puffer H	30 µl
• <i>Xba</i> I	3 µl
• Aqua dest.	178 µl

Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I, über Nacht bei 37 °C:

Material	Menge
• DNA (1 Blöckchen)	1 µg
• SuRE/Cut Puffer M	20 µl
• <i>Sfi</i> I	2 µl
• Aqua dest.	178 µl

3.9.2 Vorbereitung des Gels für die Pulsfeldgelelektrophorese und Lauf der Elektrophorese

Das Auftrennen der nach 3.9.1 präparierten DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte in einem 1,1 %igen Agarosegel (3.5.3). Nach Einsetzen der Blöckchen in die Vertiefungen des Agarosegels und Verschließen der Vertiefungen mit flüssigem 1,1 %igem Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer fand die Elektrophorese anschließend im CHEF-DR II „Pulsed Field Electrophoresis System“ mit 2 Liter zuvor auf 14 °C gekühltem 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer statt.

Als DNA-Größenstandard für die Ermittlung der Größe der Banden wurde bei der PFGE der Pulse Marker™ 0,1-200 kb (FA. SIGMA D 2291) und Pulse Marker™ 50-1.000 kb (FA. SIGMA D 2416) benutzt.

Zur Auftrennung der mit *Xba*I geschnittenen *E. coli*-DNA haben sich folgende Laufparameter bewährt:

	Lauf I	Lauf II
Spannung	6 V	6 V
Pulszeiten	5 - 20 s (linearer Gradient)	20 – 50 s (linearer Gradient)
Dauer	10 h	13 h
Temperatur	14 °C	14 °C

Zur Auftrennung der mit *Sfi*I geschnittenen *E. coli*-DNA haben sich folgende Laufparameter bewährt:

	Lauf I
Spannung	6 V
Pulszeiten	3,4 - 13 s (linearer Gradient)
Dauer	25 h
Temperatur	14 °C

3.9.3 Auswertung der Pulsfeldgelelektrophorese

Nach Ablauf der PFGE wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad (3.5.2) über 20 min gefärbt. Nicht in DNA interkaliertes Ethidiumbromid wurde in Aqua bidest. ausgeschwemmt, das Gel unter UV-Licht begutachtet und photographisch dokumentiert, wobei sich die DNA Fragmente als helle Banden vor dunklem Hintergrund darstellten.

3.9.4 Analyse der Restriktionmuster von *E. coli*

Die Restriktionsmuster von den untersuchten Stämmen wurden visuell und mittels Gel Compar-Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) analysiert, um den Grad der genetischen Verwandtschaft zu ermitteln.

3.10 *p*-Gen-Analyse

3.10.1 DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue“-Kit

Zur Präparation der bakteriellen DNA wurde das „DNeasy Tissue“-Kit (FA. QIAGEN) verwendet: Die Anzüchtung der Kulturen erfolgte in BHI-Bouillon ([3.2](#)) für 24 h bei 37 °C. Je 1,5 ml des bebrüteten Nährmediums wurde in sterile Reaktionsgefäße gegeben und für 10 min bei 7.500 rpm (5.000 x g) zentrifugiert.

Das Sediment wurde nun zur Zellwandlyse und Deproteinisierung mit 180 µl ATL-Puffer („DNeasy Tissue“-Kit) unter Zusatz von 20 µl Proteinase K („DNeasy Tissue“-Kit) versetzt und anschließend für 30 min bei 55 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Steigerung der Lyse wurde eine anschließende gute Durchmischung, Zugabe von 200 µl AL-Puffer („DNeasy Tissue“-Kit) und Inkubation für 10 min auf 70 °C durchgeführt.

Nach Zugabe von 200 µl 96 %igem Ethanol und intensiver Durchmischung wurde der Ansatz durch einen „DNeasy“ Filtereinsatz mit Silicamembran („DNeasy Tissue“-Kit) mittels Zentrifugation für 1 min bei 6.000 U (8.000 rpm) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß abfiltriert. Die an die Membran gebundene DNA konnte nun 2 x mit je 500 µl AW-Puffer („DNeasy Tissue“-Kit) gewaschen und dann zunächst bei 6.000 U (8.000 rpm) für 1 min, bzw. nach dem zweiten Waschen für 3 min zum Trocknen der Silicamembran zentrifugiert werden. Der jeweilige Überstand wurde verworfen und der „DNeasy“ Filtereinsatz mit Silicamembran in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Das Eluieren der an die Membran gebundenen DNA erfolgte mittels 25 µl AE-Puffer („DNeasy Tissue“-Kit) und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Das DNA-haltige Eluat konnte nun bei 6.000 U (8.000 rpm) abzentrifugiert und der Elutionsschritt mit 15 µl AE-Puffer zur Gewinnung weiterer DNA wiederholt werden. Die so erhaltene DNA wurde entweder direkt mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten ([3.10.3](#)) oder bei –20 °C aufbewahrt.

3.10.2 Herstellung Digoxigenin-markierter *p*-Gen-Sonden

Die *p*-Gen-Sonde wurde durch direkte Digoxigeninmarkierung in der PCR gewonnen. Als Template dienten DNA-Amplifikate von *E. coli* EDL 933, die durch die PCR für den Nachweis von *p*-Gen aus Phage λ mit DK1- und DK2-Primern (DATZ et al., 1996) hergestellt wurden.

Ansatz des PCR-Mastermixes zum Nachweis von *p*-Gen aus Phage λ :

Material	Menge
• Aqua bidest.	17,4 μ l
• 10 X Puffer mit $MgCl_2$	2,5 μ l
• dNTP –Mix (3.5.1)	0,5 μ l
• Primer DK1 (20 μ M) (Tabelle 3-1)	1,0 μ l
• Primer DK2 (20 μ M) (Tabelle 3-1)	1,0 μ l
• Polymerase AmpliTaq (5 U/ μ l)	0,1 μ l

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 22,5 μ l in ein 500 μ l Reaktionsgefäß überführt und mit je 2,5 μ l der nach 3.10.1 präparierten DNA des Stammes EDL 933 vermischt. Nach Einsetzen der Proben in den Thermocycler konnte das in Tabelle 3-1 dargestellte Temperaturprogramm gestartet werden.

Ansatz der PCR zur Herstellung der DIG-markierten *p*-Gen-Sonde:

Material	Menge
• Aqua bidest.	6,6 µl
• 10 X Puffer mit MgCl ₂	2,5 µl
• dATP (5 mM)	1,0 µl
• dCTP (5 mM)	1,0 µl
• dGTP (5 mM)	1,0 µl
• dTTP (1 mM)	3,32 µl
• DIG-11-dUTP (1 mM)	1,67 µl
• Primer DK1 (20 µM)	1,0 µl
• Primer DK2 (20 µM)	1,0 µl
• Polymerase AmpliTaq (5 U/µl)	1,0 µl
• DNA-Amplifikat von EDL 933	5,0 µl
Gesamtvolumen	25 µl

3.10.3 Verdau der *E. coli*-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, über Nacht bei 37° C:

Material	Menge
• DNA (Lösung aus dem „DNeasy Tissue“-Kit)	35 µl
• SuRE/Cut Puffer H	3,5 µl
• <i>EcoRI</i>	4,0 µl

3.10.4 Elektrophorese der geschnitten *E. coli*-DNA

Die geschnittene *E. coli*-DNA wurde mittels Elektrophorese in einem 1,0 %igen Agarosegel (3.5.4) aufgetrennt. Als DNA-Größenstandard für die Ermittlung der Größe der Banden wurde bei der Southern-Blot-Hybridisierung der DNA-Längenstandard III, Digoxigenin-markiert (FA. ROCHE 1 218 603), benutzt. Er besteht aus 13 Fragmenten (21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564 und 125 bp).

3.10.5 Southern-Blot

Der Transfer von DNA aus Agarosegelen auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte im Kapillarblotverfahren nach Southern. Nach der Elektrophorese wurde die doppelsträngige DNA durch Schwenken in HCl-Lösung (3.5.4) für 10 min depuriniert. Dann wurde die DNA mit A. bidest gereingt und durch zweimaliges Schwenken in Denaturierungslösung (3.5.4) für 15 min zu Einzelsträngen denaturiert. Vor dem Transfer wurde das Gel nochmals in A. bidest. und zweimal in Neutralisierungslösung (3.5.4) geschwenkt.

Der Aufbau des Transfersystems erfolgte nach diesem Prinzip: in einer Wanne mit Transferlösung wird ein Gestell platziert, das ein in Transferlösung getränktes Filterpapier trägt, dessen Enden in Transferlösung eintauchen. Darüber werden das gewendete Gel, die Nylonmembran, zwei in Transferlösung getränkte Filterpapiere, eine 10 cm dicke Schicht aus saugfähigem Papier, ein Glas und schließlich ein Gewicht geschichtet.

Der Transfer wurde über Nacht bei RT durchgeführt. Beim Abbau des Systems wurde die Lage der Slots auf der Nylonmembran mit einem Stift markiert und die Gele im Ethidiumbromid-Bad (3.5.2) nachgefärbt, um den vollständigen Transfer der DNA zu überprüfen. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte in einem Stratlinker (FA. HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS) für 5 min mit einer Energiedichte von $120.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$.

3.10.6 Hybridisierung mit *p*-Gen-Sonde

Für die Hybridisierung der DNA mit markierten *p*-Gen-Sonden wurde die Membran in verschraubbare Glasröhren platziert und nach Zugabe von 20 ml DIG-Hybridisierungslösung pro 100 cm² Membran 2 h bei 42 °C in einem Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die in die Hybridisierungslösung aufgenommene DNA-Sonde wurde für 10 min auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Die sich in der Glasröhre befindliche Hybridisierungslösung wurde verworfen, durch die Sonden-Hybridisierungslösung ersetzt und die Membran über Nacht bei 42 °C hybridisiert. Dann wurde die Membran (ohne die Hybridisierungslösung) bei RT unter ständigem Schwenken zweimal für je 5 min nichtstringent in 2 X Waschlösung (3.5.4) gewaschen. Das stringente Waschen des Blots wurde bei 65 °C für zweimal 15 min mit 0,5 X Waschlösung (3.5.4) durchgeführt, um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen.

3.10.7 Detektion der DNA-Sonden

Alle Schritte zur Sichtbarmachung von DNA-DNA-Hybriden wurden bei RT unter ständigem Schwenken des Blots in einer verschlossenen Plastikschaale durchgeführt. Die Äquilibration der Membran erfolgte durch Zugabe des Waschpuffers (3.5.4) für 30 min. Nach dem Verwerfen der Äquilibrationlösung, der Inkubation in 60 ml Blockierungslösung (3.5.4) für 30-60 min und dem Verwerfen der Blockierungslösung wurde die Membran für 30 min in 60 ml Anti-Digoxigenin-AP-Lösung (3.5.4) inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal für jeweils 15 min in 100 ml Waschpuffer inkubiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 2 min in 20 ml Detektionspuffer (3.5.4) äquilibriert. Die Blaufärbung des gebundenen Anti-Digoxigenin-Antikörpers wurde nach Zugabe von 20 ml Substratlösung (3.5.4) für 2-18 h im Dunkeln entwickelt. Die Membran wurde mit TE-Puffer (3.5.4) gewaschen, um die Farbreaktion zu beenden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Serotypisierung

Das O- Antigen aller 174 *E. coli* O157-Stämme wurden im Latex-Agglutinationstest (FA. OXOID) überprüft. Ausnahmslos konnte bei jedem getesteten Stamm eine Agglutination mit O157-Antikörper nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Serotypisierung einiger der untersuchten *E. coli* –Stämme, die an anderen Instituten durchgeführt wurden, sind den Anhangstabellen 10-1, 10-2, 10-3 und 10-4 zu entnehmen.

4.2 Biochemische Eigenschaften der untersuchten *E. coli* O157-Stämme

141 (81,0 %) der 174 getesteten *E. coli* O157-Isolate erwiesen sich nach 18stündiger Bebrütung auf dem HC-Medium als Sorbit-negativ. 128 (90,8 %) dieser Stämme wiesen keine β -D-Glucuronidase-Aktivität auf. Von den 33 Sorbit-positiven Stämmen konnte bei 32 Stämmen eine β -D-Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 4-1). Die Ergebnisse der Kultivierung auf HC-Agar aller untersuchten Stämme sind in den Tabellen 4-3, 4-4, 4-5 und 4-6 (Seite 98-104) wiedergegeben.

Tabelle 4-1: Biochemische Eigenschaften der 174 untersuchten *E. coli* O157-Stämme nach 18 h Kultivierung auf HC-Agar

Eigenschaften	n (%) ¹⁾
Sorbit-negativ und β -D-Glucuronidase-positiv	13 (7,5 %)
Sorbit-positiv und β -D-Glucuronidase-positiv	32 (18,4 %)
Sorbit-negativ und β -D-Glucuronidase-negativ	128 (73,5 %)
Sorbit-positiv und β -D-Glucuronidase-negativ	1 (0,6 %)

¹⁾ Anzahl (Prozent) der Stämme

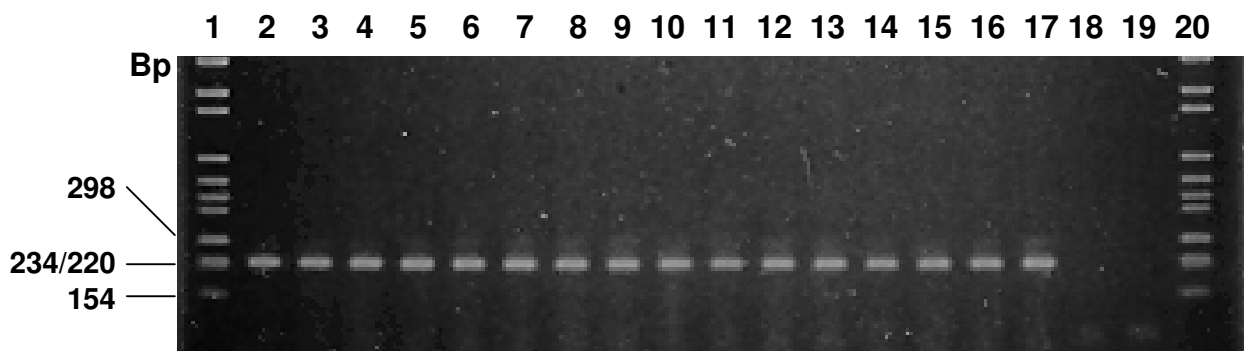
4.3 Verotoxin-Gene

Die Ergebnisse des *vtx*-Nachweises aller untersuchten Stämme sind ebenfalls in den Tabellen 4-3, 4-4, 4-5 und 4-6 wiedergegeben.

4.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis des *vtx1*-, *vtx2*- und *vtx2c*-Gens

Bei der Amplifizierung des *vtx1*-, *vtx2*- und *vtx2c*-Gens der 174 *E. coli* O157-Stämme mittels MK1- und MK2-Primern konnten zwei Fragmente (ca. 227 bp und 224 bp), die sich im Agarose-Gel optisch als eine Bande darstellen, nachgewiesen werden (Abbildung 4-1). 40 (23,0 %) Stämme besaßen kein *vtx*-Gen. 134 (77,0 %) Stämme waren *vtx*-positiv. Als Positivkontrolle wurde der Stamm *E. coli* EDL 933 verwendet.

Abbildung 4-1: Beispielhafte Darstellung der Amplifikate von *vtx1*-, *vtx2*- und *vtx2c*-positiven *E. coli* O157-Stämmen mittels Polymerasekettenreaktion. Die Spuren 2 bis 17 zeigen *vtx1*- und/oder *vtx2*- und *vtx2c*-positive Isolate. Die Spuren 1 und 20 zeigen den Marker VI. Die Spuren 18 und 19 stellen fehlende Reaktion des Kontrollstamms *Escherichia coli* C600 und der Mastermix-Kontaminationskontrolle dar

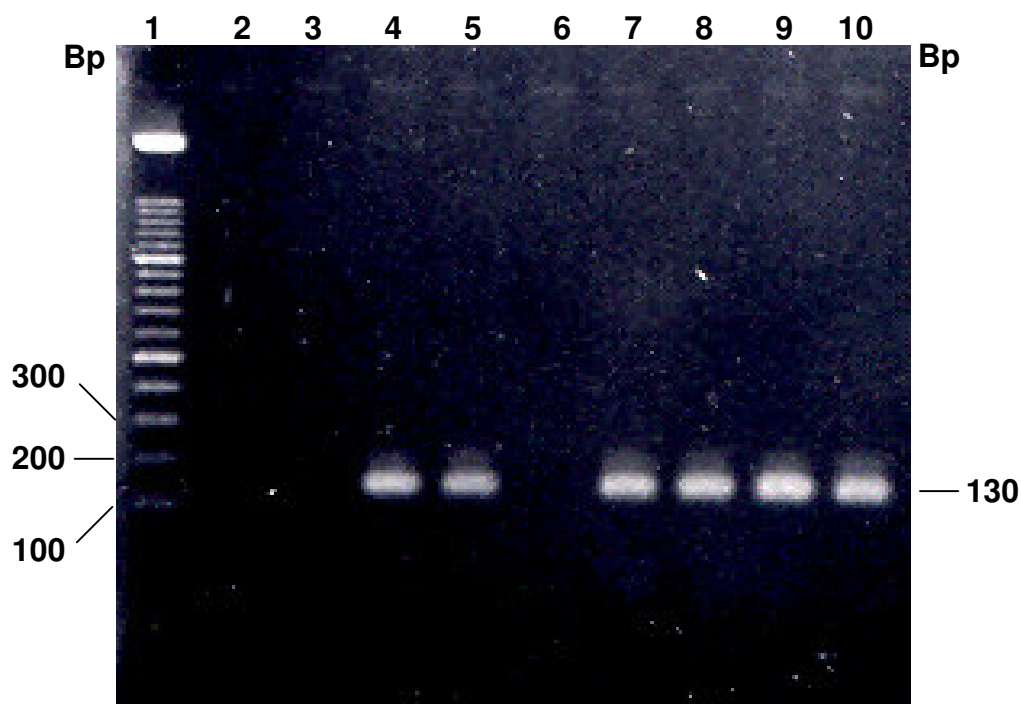


4.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis des *vtx1*-Gens

Der Nachweis des *vtx1*-Gens innerhalb der 134 *vtx*-positiven *E. coli* O157-Stämme wurde mit den VT1A- und VT1B-Primern durchgeführt. 45 (33,6 %) Stämme zeigen auf dem gefärbten Agarosegel eine Bande mit ca. 130 bp (Abbildung 4-2). Die übrigen 89 (66,4 %) Stämme besaßen kein *vtx1*-Gen.

Bei all denjenigen Stämmen, bei denen kein *vtx*-Gen mittels PCR unter Einsatz der MK1- und MK2-Primer nachweisbar war, konnte auch kein *vtx1*-Gen mit den Primern VT1A und VT1B amplifiziert werden.

Abbildung 4-2: Amplifikate des *vtx1*-Gens mit einer Größe von 130 bp. Die Spuren 4 bis 5 und 7 bis 10 zeigen *vtx1*-positive Isolate. Die Spuren 2, 3 und 6 zeigen *vtx1*-negative Isolate. In Spur 1 ist der Marker XIV aufgetragen



4.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *vtx2*- und *vtx2c*-Genen

Die Ergebnisse der Bestimmung des *vtx2*- und/oder *vtx2c*-Gens innerhalb der 134 *vtx*-positiven *E. coli* O157-Stämme mit den GK3- und GK4-Primern sowie nachfolgendem Amplifikatverdau mit *HaeIII* zeigen, dass 27 (20,3 %) Stämme sowohl *vtx2* als auch *vtx2c*-positiv waren. 68 (51,1 %) Stämme wiesen nur das *vtx2*-Gen auf, wohingegen bei 38 (28,6 %) Stämmen lediglich die *vtx2c*-Variante nachweisbar war.

Bei der Amplifizierung von *vtx2* (Varianten *vtx2* oder/und *vtx2c*)-Genen erschien auf dem Agarosegel eine ca. 270 bp große Bande (Abbildung 4-3). Amplifikate des *vtx2*-Gens wurden durch den nachfolgenden Verdau mit *HaeIII* nicht geschnitten. Amplifikate des *vtx2c*-Gens hingegen wurden geschnitten, so dass 2 Fragmente mit ca. 128 bp und 142 bp nachgewiesen werden könnten (Abbildung 4-4).

Alle Stämme, bei denen keine Amplifizierung eines *vtx*-Gens durch PCR mit MK1- und MK2-Primern gelang, zeigten sich auch in der PCR mit den Primern GK3 und GK4 zur Amplifizierung von *vtx2* (Varianten *vtx2* oder/und *vtx2c*)-Genabschnitten negativ.

Nur ein *E. coli* O157-Stamm (Stamm 408 aus Rinderkot) erwies sich als alleinig *vtx1*-positiv. Alle andere *vtx1*-positiven Stämme waren gleichzeitig positiv für *vtx2* und/oder *vtx2c* (n = 44). Von diesen 44 Stämmen wiesen 3 (6,8 %) Stuhlisolate gleichzeitig das *vtx2*- und das *vtx2c*-Gen auf. 32 (72,7 %) Stämme erwiesen sich als *vtx2*-positiv (darunter 12 Lebensmittel- und 20 Stuhlisolate), die restlichen neun (20,5 %) als *vtx2c*-positiv; diese wurden ursprünglich aus Rinderkot (n = 2) bzw. Stuhl (n = 7) isoliert (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Nachweis von unterschiedlichen *vtx*-Genen bei 174 *E. coli* O157-Stämmen unterschiedlicher Herkunft

Herkunft	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2</i> und <i>vtx2c</i>	<i>vtx1/vtx2/vtx2c</i>	<i>vtx1/vtx2c</i>	<i>vtx1/vtx2</i>	<i>vtx-neg.</i>
Patienten (n = 70)	-	30	4	15	3	1	17	-
symptomlose Ausscheider (n = 12)	-	1	2	-	-	6	3	-
Lebensmittel (n = 41)	-	3	4	7	-	-	12	15
Rinderkot (n = 42)	1	1	17	2	- ¹⁾	2	-	19
Pferdekot (n = 6)	-	1	-	-	-	-	-	5
Kälberkot (n = 2)	-	-	2	-	-	-	-	-
Hundekot (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-	1
Summe (n = 174)	1	36	29	24	3	9	32	40

¹⁾ negatives PCR-Ergebnis

Abbildung 4-3: Amplifikate des *vtx2* (Varianten *vtx2* oder/und *vtx2c*)-Gens mit einer Größe von 270 bp. Die Spuren 2 bis 5, 7 bis 16 und 18 bis 19 zeigen *vtx2* (Varianten *vtx2* oder/und *vtx2c*)-positive Isolate. Die Spuren 6 und 17 zeigen *vtx2* (Varianten *vtx2* und *vtx2c*)-negative Isolate. In Spuren 1 und 20 ist der Marker VI aufgetragen

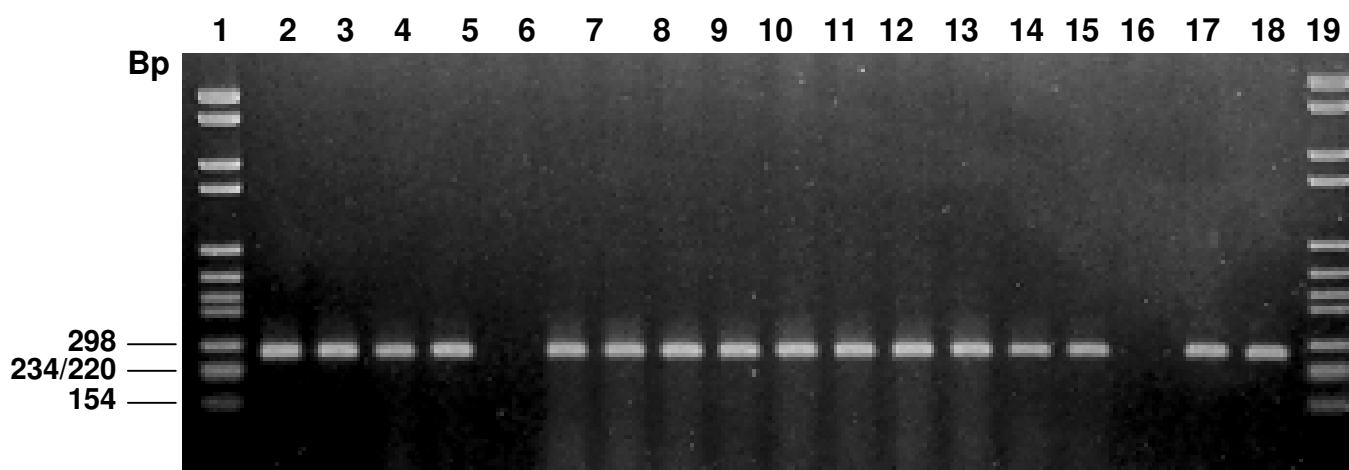


Abbildung 4-4: Nachweis von *vtx2c* (Amplifikat geschnitten) und *vtx2* (Amplifikat ungeschnitten mit 270 bp) mit dem *Hae*III-Restriktionsenzymverbau nach der Polymerasekettenreaktion. Die Spuren 1 und 2 zeigen *vtx2c*-positive Isolate (zwei Fragmente mit ca. 128 bp und 142 bp). Die Spuren 4 und 5 zeigen *vtx2*-positive Isolate. In Spur 3 ist der Marker XIV aufgetragen

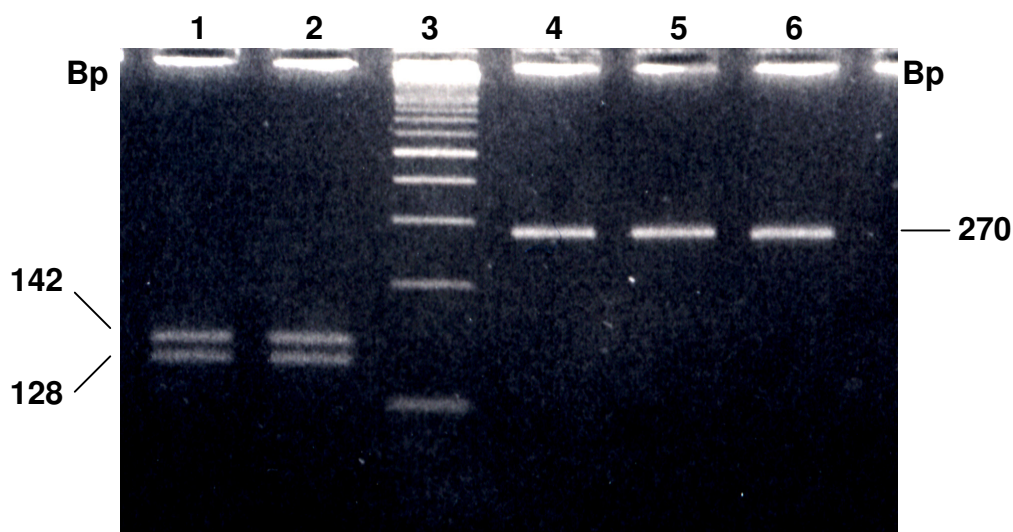


Tabelle 4-3: *vtx*-Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei 70 *E. coli* O157-Stämmen aus Stuhlproben von Patienten

Stamm	<i>vtx1</i> / <i>vtx2</i> ¹⁾	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	Sorbit- Verwertung ²⁾	β -D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
HUS 1249	+ ³⁾	+	+	- ⁴⁾	-	-
HC 2044	+	+	+	-	-	-
E 1047	+	+	+	-	-	-
E 1177	+	+	+	-	-	-
7579/95	+	-	+	-	+	+
E 1161	+	+	+	-	-	-
E 4884	+	+	+	-	-	-
3978/91	+	-	+	+	-	-
3232/96	+	-	+	+	-	-
3075/96	+	-	+	+	-	-
3010/96	+	-	-	+	-	-
6652/95	+	+	+	+	-	-
136/36	+	+	+	-	-	-
1104/96	+	-	+	-	+	+
NCTC 12080	+	-	+	+	-	-
EDL 931	+	+	+	-	-	-
C 7-80	+	+	-	+	-	-
C 999-87	+	-	+	+	-	-
C 1011-87	+	-	+	+	-	-
C 1403-83	+	+	+	-	-	-
1271-84	+	-	+	+	-	-
3526-87	+	+	+	+	-	-
A 9047-CS1	+	+	+	-	-	-
A 9167-1	+	+	-	+	-	-
B 1189-1	+	+	+	-	-	-
B 2576	+	-	+	-	-	-
3149-85	+	+	+	-	-	-
CI 8	+	+	+	-	-	-
CI 40	+	+	+	-	-	-
CI 56	+	+	+	-	-	-
DSM 8579	+	-	+	-	-	-
NCTC 12079	+	+	+	-	-	-
4746/97	+	-	+	+	-	-
4747/97	+	-	+	-	-	-
3837/97	+	-	+	-	-	-
3617/97	+	-	+	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 4-3:

Stamm	<i>vtx1</i> / <i>vtx2</i> ¹⁾	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	Sorbit- Verwertung ²⁾	β-D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
4460/97	+	-	+	-	-	-
2575/97	+	-	+	-	-	-
3803/97	+	-	+	-	-	-
3806/97	+	-	+	-	-	-
4427/97	+	-	+	-	-	-
4596/97	+	-	+	-	-	-
3734/97	+	-	+	-	-	-
3738/97	+	-	+	-	-	-
3745/97	+	-	+	-	-	-
3746/97	+	-	+	-	-	-
3655/97	+	-	+	-	-	-
3656/97	+	-	+	+	-	-
3736/97	+	-	+	+	-	-
3733/97	+	-	+	-	-	-
3744/97	+	-	+	+	-	-
3856/97	+	-	-	+	-	-
3857/97	+	-	+	+	-	-
3737/97	+	-	+	+	-	-
CB 7060	+	-	+	-	-	-
6216/96	+	-	-	+	-	-
17069	+	+	+	+	-	-
RL 105/96	+	-	+	-	-	+
RL 106/96	+	-	+	-	-	+
RL 107/96	+	-	+	-	-	+
6504/95	+	-	+	+	-	-
6292/95	+	-	+	+	-	-
6334/96	+	-	+	-	-	-
38394/1	+	-	+	-	-	-
38394/6/1-1	+	-	+	-	+	-
V 6/1	+	-	+	-	-	-
V 1/1	+	-	+	-	-	-
V 2/1	+	-	+	-	-	-
VD 1	+	-	+	-	-	-
W1	+	-	+	-	-	-
Summe	70	21	65	23	3	5

¹⁾ mit Primern MK1 und MK2²⁾ bestimmt auf dem HC-Agar³⁾ positiv⁴⁾ negativ

Tabelle 4-4: *vtx*-Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei 12 *E. coli* O157-Stämmen aus Stuhlproben von symptomlosen Ausscheidern

Stamm	<i>vtx1</i> / <i>vtx2</i> ¹⁾	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	Sorbit- Verwertung ²⁾	β -D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
VW Stuhl I	+ ³⁾	- ⁴⁾	+	-	-	-
12/1	+	+	+	-	-	-
12/4	+	+	-	+	-	-
12/5	+	+	+	-	-	-
12/7	+	+	+	-	-	-
26/22	+	+	-	+	-	-
1-2-3-6/9	+	+	-	+	-	-
1-2-3-6/14	+	+	-	+	-	-
1-2-3-6/15	+	+	-	+	-	-
1-2-3-6/83b	+	+	-	+	-	-
791/98	+	-	-	+	-	-
14/SLB	+	-	-	+	-	-
Summe	12	9	4	8	0	0

¹⁾ mit Primern MK1 und MK2

²⁾ bestimmt auf dem HC-Agar

²⁾ positiv

³⁾ negativ

Tabelle 4-5: *vtx*-Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei 41 *E. coli* O157-Stämmen aus Lebensmitteln

Stamm	<i>vtx1</i> / <i>vtx2</i> ¹⁾	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	Sorbit- Verwertung ²⁾	β -D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
Sal 4/LXIV/1	+ ³⁾	- ⁴⁾	+	+	-	-
Sal 57/4/1-99	+	-	-	+	-	-
86-62374.96 -2	-	-	-	-	-	+
86-62374.96 -3	-	-	-	-	-	+
3873 5/1	+	+	+	-	-	-
BU 1464/2	+	-	-	+	-	-
BU 1464/3	+	-	-	+	-	-
740	+	-	+	+	-	-
R4	+	-	+	+	-	-
654	+	-	+	+	-	-
730	+	-	+	+	-	-
1204	+	-	+	+	-	-
E 140	+	+	+	-	-	-
E 141	+	+	+	-	-	-
E 142	+	+	+	-	-	-
E 144	+	+	+	-	-	-
H 4	-	-	-	-	-	+
Schu 1	-	-	-	-	-	+
Schu 2	-	-	-	-	-	+
Schu 3	-	-	-	-	-	+
EDL 933	+	+	+	-	-	-
C 7 KJS	+	-	+	+	-	-
C 9 KJS	-	-	-	-	-	-
C 12 KJS	+	+	+	-	-	-
C 13 KJS	+	+	+	-	-	-
C 14 KJS	+	+	+	-	-	-
326 HF	-	-	-	-	+	+
327 HF	-	-	-	-	+	+
E 214	-	-	-	-	+	+
E 205	-	-	-	-	+	+

Fortsetzung Tabelle 4-5:

Stamm	<i>vtx1</i> / <i>vtx2</i> ¹⁾	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	Sorbit- Verwertung ²⁾	β-D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
E 213	-	-	-	-	+	+
D 1	+	-	-	+	-	-
#51	-	-	-	-	+	+
1997/05490/1- 1/7	+	-	+	-	-	-
B569797	+	+	+	-	-	-
LM 284/97	+	+	+	-	-	-
L 694/98- SK1	+	-	+	-	-	-
L 694/98-SK4	+	-	+	-	-	-
7301/2	+	+	+	-	-	-
SK2	-	-	-	-	-	+
SK3	-	-	-	-	-	+
Summe	26	12	22	11	6	14

¹⁾ mit Primern MK1 und MK2

²⁾ bestimmt auf dem HC-Agar

³⁾ positiv

⁴⁾ negativ

Tabelle 4-6: *vtx*-Gene, Sorbitverwertung und β -D-Glucuronidase-Reaktion bei 51 *E. coli* O157-Stämmen aus 42 Kotproben von 35 Rindern, sechs von sechs Pferden, zwei von zwei Kälbern und einer von einem Hund

Stamm	<i>vtx1</i> / <i>vtx2</i> ¹⁾	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2c</i>	Sorbit- Verwertung ²⁾	β -D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
B 2325	+	- ⁴⁾	-	+	-	-
B 2482	+	-	-	+	-	-
B 2324	+	-	-	+	-	-
E 124	+	-	-	+	-	-
MH 1038	+	-	+	-	-	-
1495/27-1	+	+	-	+	-	-
1495/27-2	+	+	-	+	-	-
408	+	+	-	-	-	-
409	+	-	+	+	-	-
326	+	-	-	+	-	-
409/1	+	-	+	+	-	-
326/1	+	-	-	+	-	-
R 19/1	+	-	-	+	-	-
R 19/2	-	-	-	-	+	+
R 27	+	-	-	+	-	-
R 28/1	+	-	-	+	-	-
R 28/2	-	-	-	-	+	+
R 34/1	+	-	-	+	-	-
R 34/2	+	-	-	+	-	-
R 35/1	+	-	-	+	-	-
R 35/2	-	-	-	-	+	+
R 36	+	-	-	+	-	-
R 37	-	-	-	-	+	+
R 38/1	-	-	-	-	+	+
R 38/2	+	-	-	+	-	-
R 38/3	+	-	-	+	-	-
R 43	-	-	-	-	+	+
R 44	-	-	-	-	+	+
R 45	-	-	-	-	+	+
R 46	+	-	-	+	-	-
R 54	-	-	-	-	+	+

Fortsetzung Tabelle 4-6:

Stamm	vtx1/ vtx2 ¹⁾	vtx1	vtx2	vtx2c	Sorbit- Verwertung ²⁾	β-D- Glucuronidase- Aktivität ²⁾
R 11	-	-	-	-	+	+
R 13	-	-	-	-	+	+
R 15	-	-	-	-	+	+
R 18	-	-	-	-	+	+
R 20	-	-	-	-	+	+
R 24	-	-	-	-	+	+
R 25	-	-	-	-	+	+
R 26	-	-	-	-	+	+
R 39/1	+	-	-	+	-	-
R 39/2	-	-	-	-	+	+
R 60	-	-	-	-	+	+
MG 10/1-00	-	n.u. ⁵⁾	n.u.	n.u.	-	+
MG 23/1-00	-	n.u.	n.u.	n.u.	-	+
MG 22/1-00	-	n.u.	n.u.	n.u.	+	+
MG 7/1-00	-	n.u.	n.u.	n.u.	+	+
MG 52/1-00	-	n.u.	n.u.	n.u.	+	+
3547/99	+	-	+	-	+	+
RW 0072 Wieler	+	-	-	+	-	-
653 Wieler	+	-	-	+	-	-
1494/6	-	n.u.	n.u.	n.u.	+	+
Summe	26	3	4	23	24	26

¹⁾ mit den Primern MK1 und MK2²⁾ bestimmt auf dem HC-Agar³⁾ positiv⁴⁾ negativ⁵⁾ nicht untersucht

4.4 Makrorestriktionsanalyse

Für die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft aller einbezogenen Stämme wurden die jeweiligen *Xba*I-Restriktionsfragmentmuster (RFM) zunächst visuell und abschließend mittels Gel Compar-Software analysiert. Die *Sfi*I-RFM wurden lediglich visuell analysiert, und mit den Ergebnissen der *Xba*I-RFM verglichen.

Bei den 30 *E. coli* O157-Stämmen, die aus Kotproben von 23 Rindern einer Mutterkuhherde aus Rudlos (Deutschland) isoliert wurden, wurde die Verwandtschaft nur mittels PFGE mit *Xba*I-Enzym analysiert.

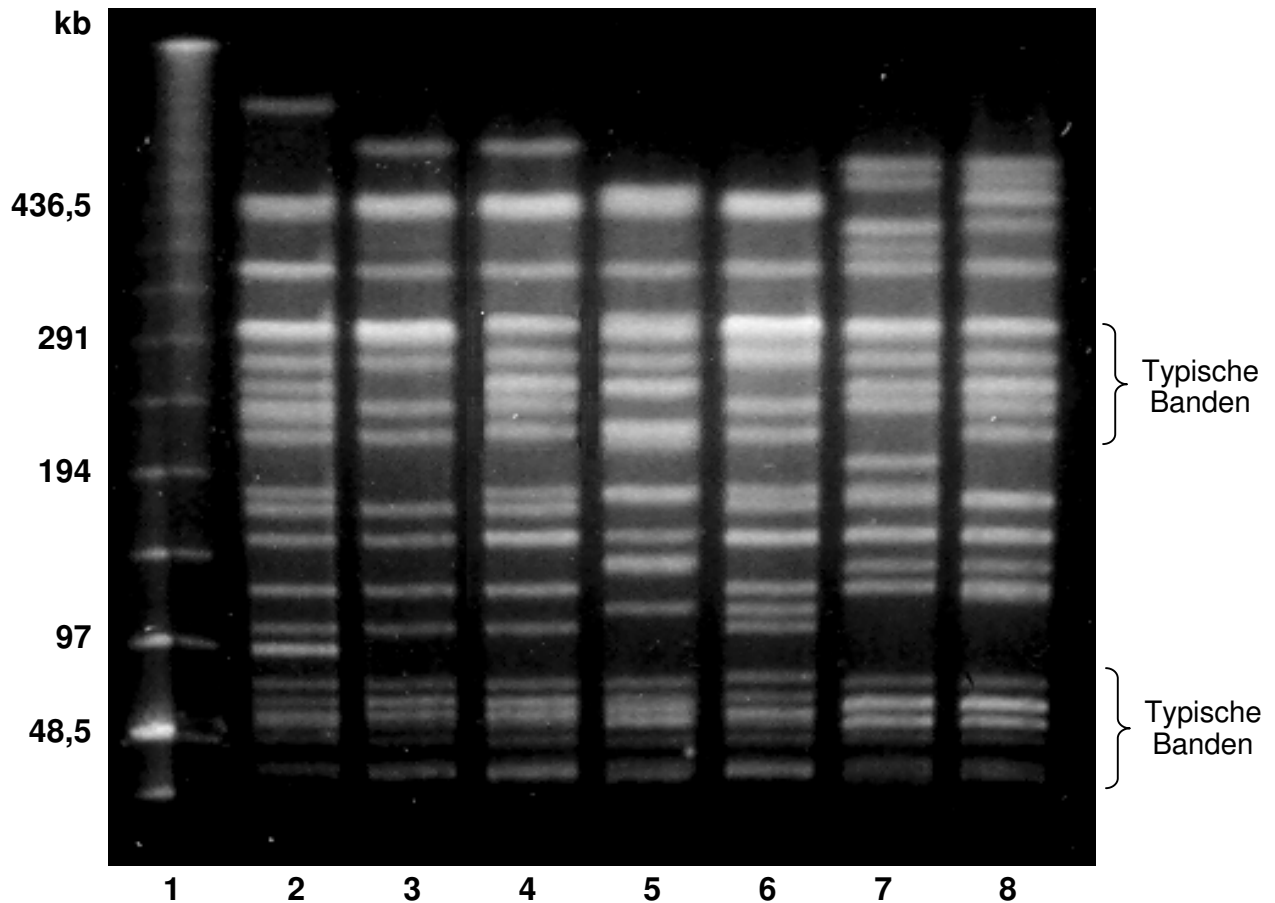
4.4.1 *Xba*I-Verdau

Bei der *Xba*I-PFGE wurden alle 175 Stämme (einschließlich Stamm NCTC 12900) untersucht.

4.4.1.1 Visuelle Auswertung

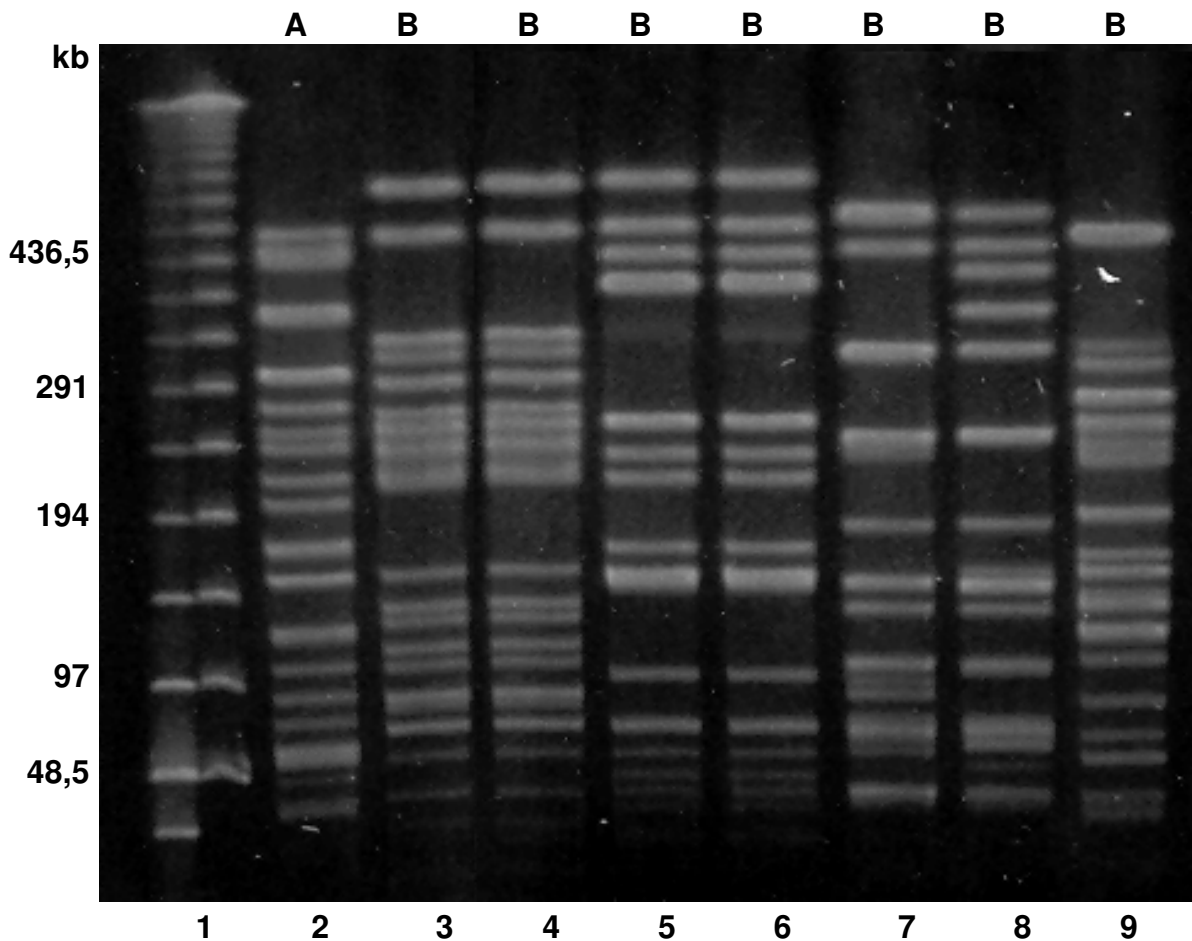
Basierend auf der visuellen Analyse von *Xba*I-RFM wurden die Stämme in die Gruppen A und B eingeteilt. Die Stämme der Gruppe A besaßen eigene typische Banden, die zwischen 295 kb und 218 kb sowie zusätzlich zwischen 73 kb und 25 kb angesiedelt waren. Zwischen 295 kb und 218 kb zeigten die RFM fünf, vier (eine Bande fehlend) oder drei Banden (zwei Banden fehlend) gleicher Größe oder mit kleineren Abweichungen (Abbildung 4-5). Die Stämme von Gruppe B besaßen ein davon differentes und nicht homogenes Bandenspektrum (Abbildung 4-6). Innerhalb einer Gruppe wurden alle Stämme bestimmten *Xba*I-RFM zugeordnet. Diese *Xba*I-RFM wurden mit dem Gruppen-Buchstaben und einer fortlaufenden Nummer bezeichnet (z. B. Stamm EDL 933 gehört zur *Xba*I-RFM A34). Lag ein deckungsgleiches Bandenmuster vor, so wurden die entsprechenden Stämme einem bestimmten (gleichen) *Xba*I-RFM zugeordnet. Auch denjenigen Stämmen, die sich von allen anderen unterschieden, wurde eine *Xba*I-RFM-Bezeichnung zugeteilt. Innerhalb der *Xba*I-RFM waren 14 bis 21 Banden zu erkennen.

Abbildung 4-5: Beispielhafte Darstellung einer *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNA von acht *E. coli* O157–Stämmen der Gruppe A



Spur 1: “low range” PFGE Marker (0,1 – 200 kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50 -1000 kb), **Spur 2:** HC 2044 – *Xba*I-RFM A34, **Spur 3:** E 1047 – *Xba*I-RFM A48, **Spur 4:** HUS 1249 – *Xba*I-RFM A4, **Spur 5:** C 7-80 – *Xba*I-RFM A53, **Spur 6:** 3526-87 – *Xba*I-RFM A49; **Spur 7:** 38394/6/1-1 – *Xba*I-RFM A52; **Spur 8:** C 999-87 – *Xba*I-RFM A14

Abbildung 4-6: Beispielhafte Darstellung einer *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNA von acht *E. coli* O157-Stämmen der Gruppen A und B



Spur 1: "low range" PFGE Marker (0,1 – 200 kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50 -1000 kb), **Spur 2:** 14/SLB – *Xba*I-RFM A60, **Spur 3:** 326 - HF – *Xba*I-RFM B11, **Spur 4:** 327 - HF – *Xba*I-RFM B11, **Spur 5:** MG 10/1-00 – *Xba*I-RFM B12, **Spur 6:** MG 23/1-00 – *Xba*I-RFM B12, **Spur 7:** MG 22/1-00 – *Xba*I-RFM B13; **Spur 8:** MG 7/1-00 – *Xba*I-RFM B14; **Spur 9:** MG 52/1-00 – *Xba*I-RFM B15

4.4.1.2 Gel Compar-Software Analyse

Zwischen allen 175 (einschließlich Stamm NCTC 12900) untersuchten *E. coli* O157-Stämmen konnte mittels PFGE bei Verdau mit *Xba*I eine Verwandtschaft von $53,4 \pm 6,4$ % gefunden werden (Dice-Koeffizient mit 1,2%iger Toleranz). Insgesamt wurden 85 *Xba*I-RFM gefunden, wobei RFM A63 (Laborstamm NCTC 12900) einbezogen wurde.

Alle Stämme wurden je nach Herkunft in verschiedene Gruppen eingeteilt (Stuhlproben von Erkrankten sowie von symptomlosen Ausscheidern, Lebensmittel und Kotproben von Tieren). Der Dice-Koeffizient (mit 1,2 %iger Toleranz) zwischen den Stämmen der einzelnen Gruppe betrug: für die Gruppe der Patienten-Isolate $64,8 \pm 5,1$ % (Anhangsabbildung 10-1), für die Gruppe der Isolate von symptomlosen Ausscheidern $75,7 \pm 3,5$ % (Anhangsabbildung 10-2), für Lebensmittel-Isolate $58,8 \pm 5,3$ % (Anhangsabbildung 10-3) und für Isolate aus Kotproben $60,9 \pm 5,5$ % (Anhangsabbildung 10-4).

Bei der Gel Compar-Software-Analyse wurde jedes einzelne *Xba*I-Bandenmuster mit dem *Xba*I-RFM von *Escherichia coli* EDL 933 verglichen (Anhangstabelle 10-1, 10-2, 10-3 und 10-4). Dieser Stamm wurde als Referenzstamm ausgewählt, da er in Verbindung mit dem 1982 in den USA aufgetretenen Hämorrhagische Colitis-Ausbruch aus Hamburgern isoliert wurde. Dieses Vergleichsverfahren wurde auch mittels Dice-Koeffizient mit 1,2%iger Toleranz durchgeführt. Die Stämme von Gruppe A zeigen zu EDL 933 eine Verwandtschaft von 73,7 % bis 100% und die Stämme von Gruppe B von 48,5 % bis 78,9 %.

Von den 84 (*Xba*I-RFM A63 von Stamm NCTC 12900 wurde nicht mitgezählt) *Xba*I-RFM wurden 28 bei mehr als einem Stamm gefunden (Tabelle 4-7). In fünf von diesen 28 *Xba*I-RFM (A2, A4, A23, A34 und A37) fanden sich Stämme, die aus unterschiedlichen Habitaten (Kot, Lebensmittel oder Stuhl) und an unterschiedlichen Orten isoliert wurden (Abbildung 4-7 zeigt *Xba*I-RFM A2, A4, A34 und A37). Im Gegensatz dazu erschien die Gruppe des *Xba*I-RFM A23 relativ homogen. Zwei der drei darin enthaltenen Stämme wurden aus dem gleichen Material in der gleichen

Region isoliert; lediglich ein Stamm wies eine davon verschiedene Herkunft auf. Die übrigen 23 *Xba*I-RFM (A1, A6, A10, A12, A15, A16, A19, A21, A25, A26, A27, A30, A52, B1, B4, B7, B9, B11, B12, B16 und B20, B21 und B22) wurden bei Stämmen aus dem gleichen Probenmaterial gefunden, wobei fünf Stämme aus dieser *Xba*I-RFM-Gruppe (A1, A15, A16, A19 und B1) an unterschiedlichen Orten isoliert wurden. Die Übereinstimmungsraten zwischen allen *Xba*I-RFM wurden mit Hilfe eines Dendrogramms dargestellt, um die Verwandtschaft zwischen allen Stämme aufzuzeigen (Abbildung 4-8).

Tabelle 4-7: Beziehung zwischen den 28-*Xba*I-RFM-Gruppen (insgesamt 118 Stämme) mit Angabe der Stamm-Nummer, dem Probenmaterial und der Herkunft

<i>Xba</i> I-RFM	Stämme (n) ¹⁾	Kot (n)	Lebensmittel (n)	Stuhl (n)	Ort (N) ²⁾	Land
A1	3	3	-	-	2	D ³⁾
A2	4	1	2	1	4	D
A4	12	-	4	8	8	D, K ⁴⁾ , USA ⁵⁾
A6	5	-	-	5	1	D
A10	3	-	-	3	1	D
A12	2	-	2	-	1	USA
A15	2	-	-	2	2	D, Dä ⁶⁾
A16	2	-	-	2	2	Dä, S ⁷⁾
A19	4	-	-	4	3	D, USA
A21	2	-	2	-	1	D
A23	3	-	2	1	2	D
A25	2	2	-	-	1	D
A26	12	-	-	12	1	D
A27	2	-	-	2	1	D
A30	2	2	-	-	1	P ⁸⁾
A34	3	-	1	2	3	D, USA
A37	8	-	7	1	4	D, S
A52	2	-	-	2	1	D
B1	5	-	-	5	2	D
B4	9	9	-	-	1 ^{*9)}	D
B7	4	-	4	-	1	D
B9	2	-	2	-	1	D
B11	2	-	2	-	1	CH ¹⁰⁾
B12	2	2	-	-	1	D
B16	2	-	2	-	1	D
B20	3	3	-	-	1*	D
B21	12	12	-	-	1*	D
B22	4	4	-	-	1*	D

¹⁾ Anzahl der Stämme

²⁾ Anzahl der Orte

³⁾ Deutschland

⁴⁾ Kanada

⁵⁾ Vereinigte Staaten von Amerika

⁶⁾ Dänemark

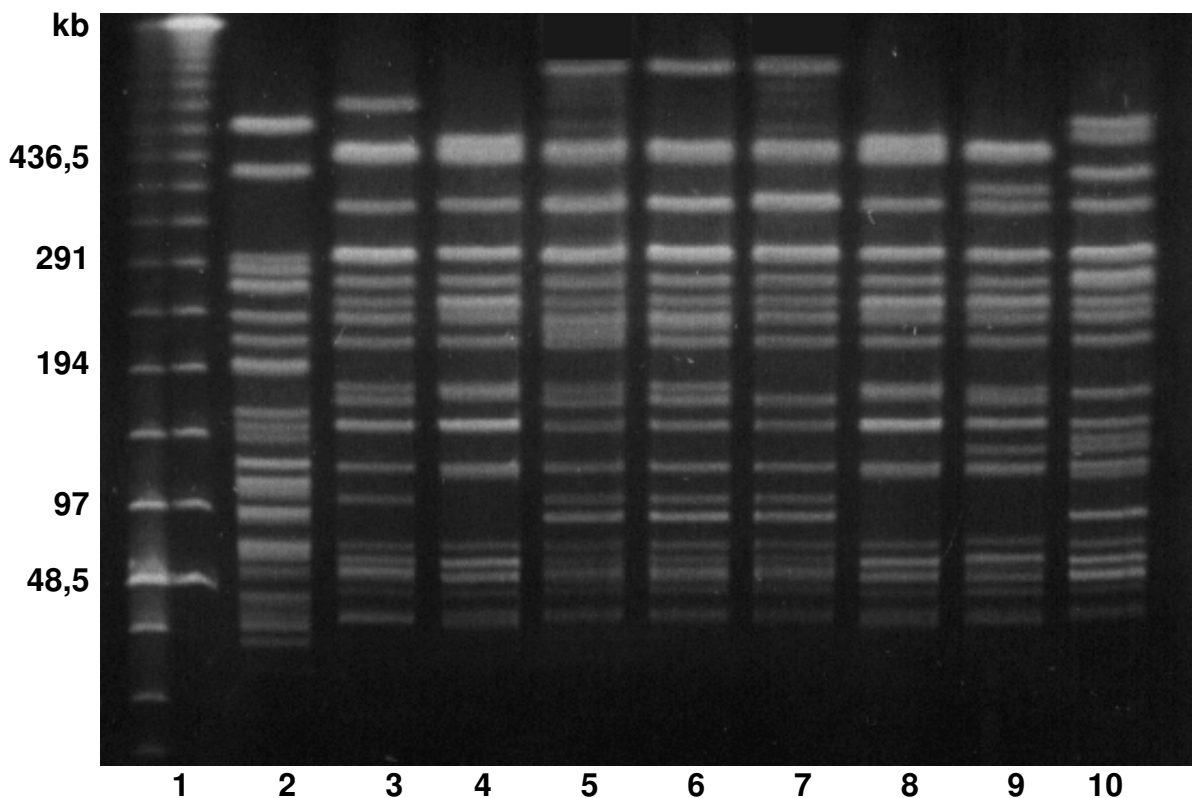
⁷⁾ Schottland

⁸⁾ Polen

⁹⁾ * Isolate aus Rudlos

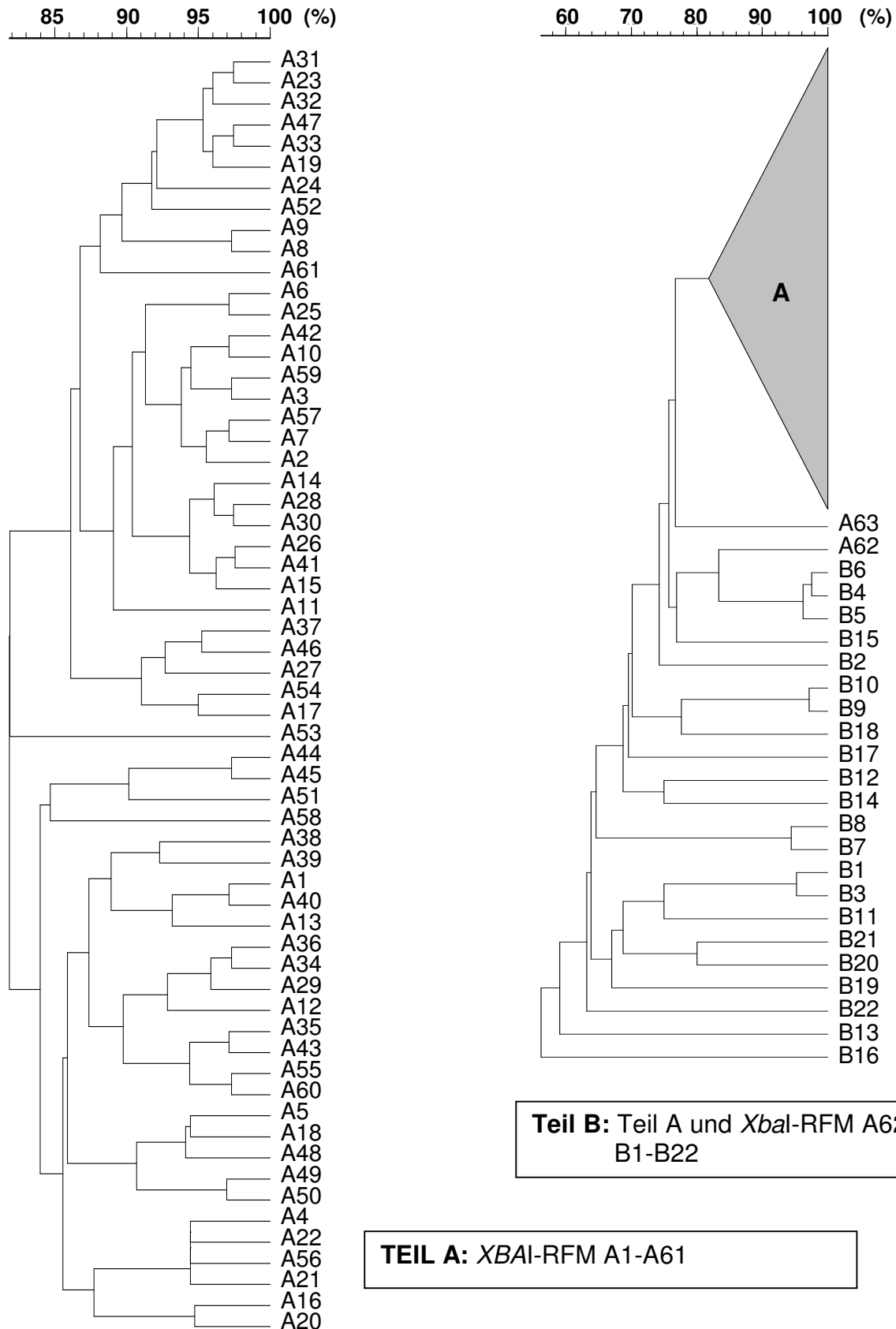
¹⁰⁾ Schweiz

Abbildung 4-7: Beispielhafte Darstellung einer *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNA von neun *E. coli* O157-Isolaten der Gruppen B und A



Spur 1: “low range” PFGE Marker (0,1 – 200 kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50 –1000 kb), **Spur 2:** 7579/95 – *Xba*I-RFM B1, **Spur 3:** 12/1– *Xba*I-RFM A4, **Spur 4:** 12/4 – *Xba*I-RFM A2, **Spur 5:** 12/5 – *Xba*I-RFM A34, **Spur 6:** 12/6 – *Xba*I-RFM A34, **Spur 7:** 12/7 – *Xba*I-RFM A36, **Spur 8:** 12/19 – *Xba*I-RFM A2, **Spur 9:** 26/22 – *Xba*I-RFM A6, **Spur 10:** 740 – *Xba*I-RFM A37

Abbildung 4-8: Dendrogramm der RFM (n = 85) (einschließlich RFM A63 des Stammes NCTC 12900) der genetischen Verwandtschaft der mittels PFGE bei Verdau mit *XbaI* untersuchten *E. coli* O157-Stämme, dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz

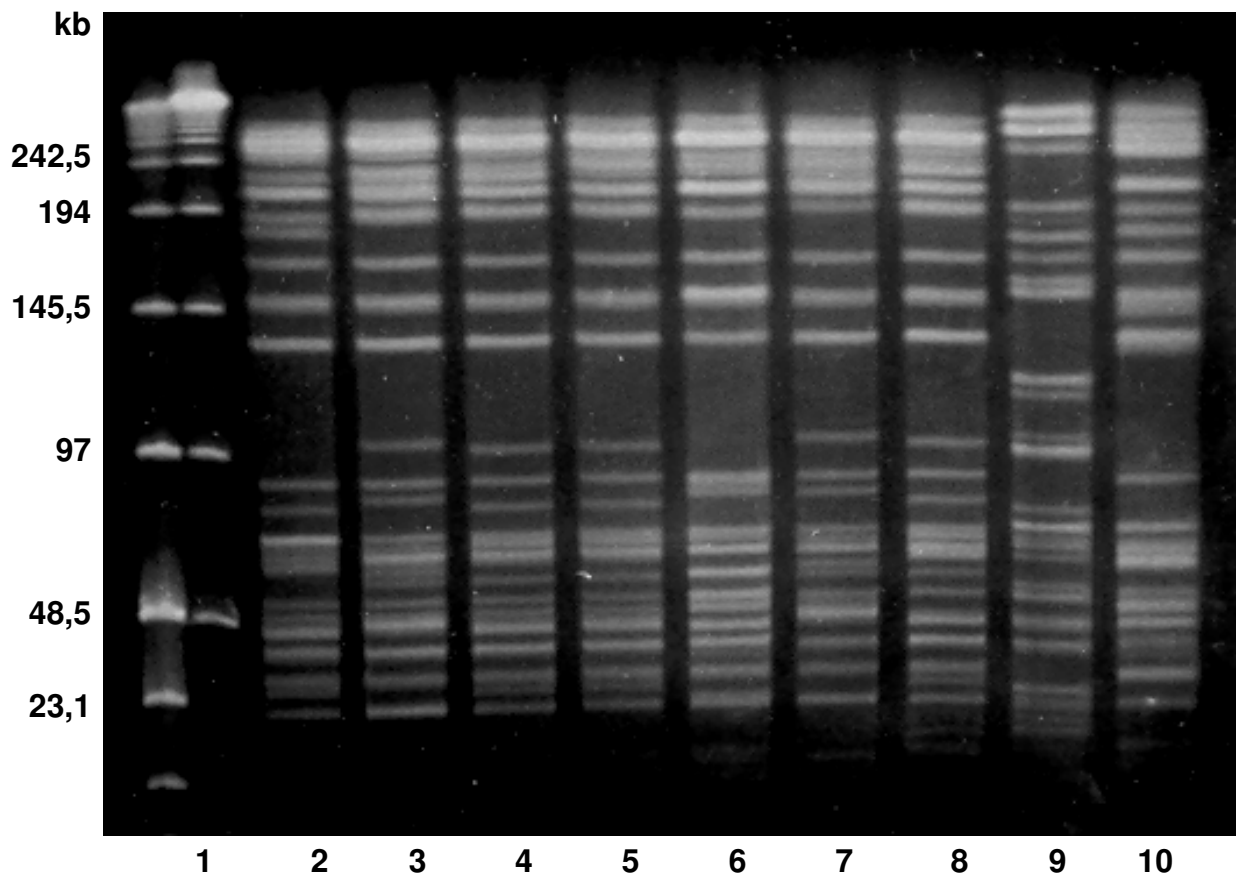


4.4.2 *Sfi*I-Verdau

Bei der *Sfi*I-PFGE wurden 145 Stämme untersucht. Die 30 *E. coli* O157-Stämme aus Rinderkot von 23 Tieren einer Mutterkuhherde aus Rudlos (Deutschland) wurden nicht mittels *Sfi*I-PFGE untersucht.

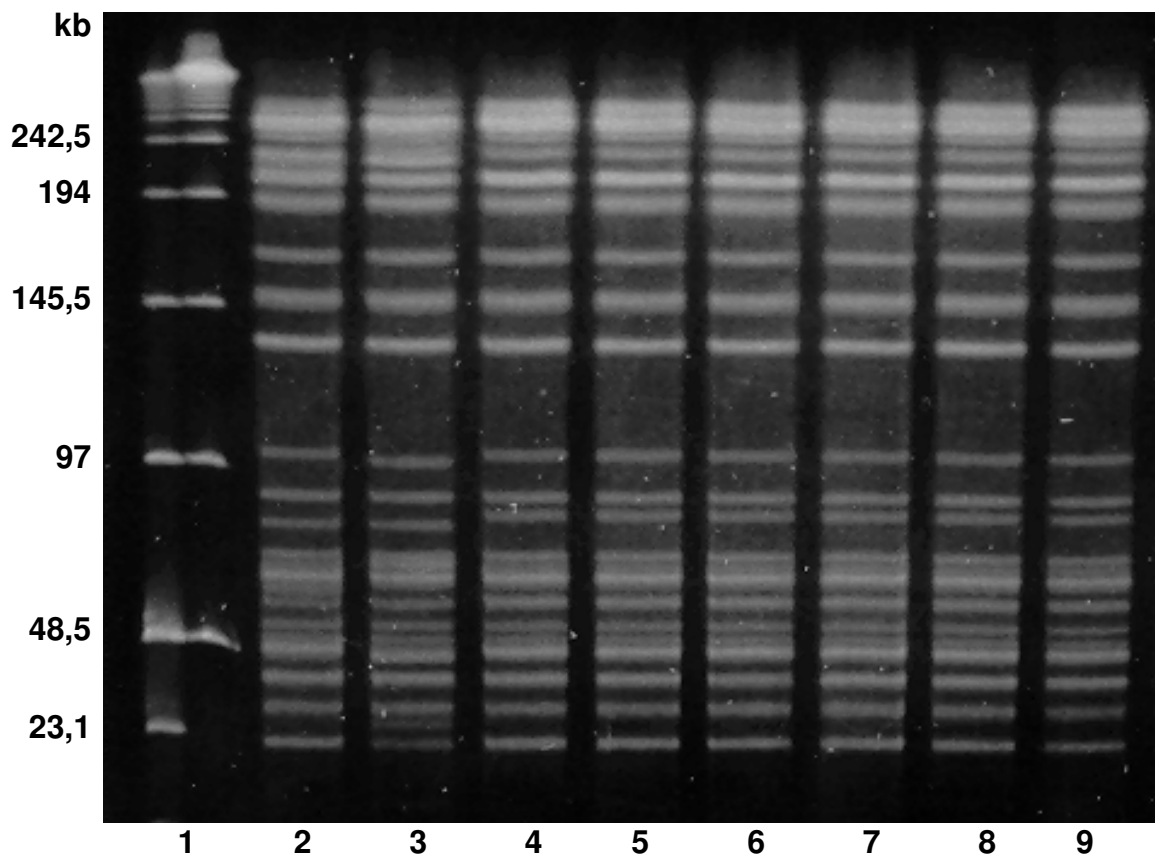
Der Verdau mit *Sfi*I wurde durchgeführt, um eine bessere Differenzierung im Vergleich mit dem *Xba*I-Verdau der *E. coli* O157-Stämme zu erreichen. Die Ergebnisse vom *Sfi*I-Verdau wurden nur visuell analysiert. *Sfi*I-RFM zeigen mehr Banden als *Xba*I-RFM. Trotzdem konnte festgestellt werden, dass mit der *Xba*I-Analyse mehr Unterschiede zwischen den einzelnen *E. coli* O157-Stämmen gezeigt werden konnten als mit der *Sfi*I-Analyse. So wiesen beispielsweise die Stämme BU 1464/2 und BU 1464/3 unterschiedliche *Xba*I-RFM auf, sie gehörten zu *Xba*I-RFM A7 und *Xba*I-RFM A2 (eine Bande weniger als A7), wohingegen bei *Sfi*I keine Unterschiede erkannt werden konnten (Abbildung 4-9). Gleiches wurde bei *Xba*I-RFM A3 und A11 beobachtet. Bei lediglich zwei der ermittelten 28 *Xba*I-RFM, die mehr als einen Stamm enthielten, traten jedoch Stämme auf, die trotz identischer *Xba*I-RFM kleine Unterschiede in der *Sfi*I-RFM-Analyse zeigten. Diese Stämme gehören den *Xba*I-RFM A4 und A15 (Stamm C1011-87 und 3746/97) an. Die Stämme des *Xba*I-RFM A4 wurden im *Sfi*I-Verdau in zwei sehr ähnliche *Sfi*I-RFM-Gruppen eingeteilt. In einer Gruppe waren die Stämme HUS 1249, 12/1, E1161, 136/36, EDL 931, B 1189-1 und CI 8 eingeordnet; in der anderen Gruppe die Stämme 3873 5/1, CI 40, B569797, LM 284/97 und 7301/2 (Abbildung 4-10). In allen 26 anderen *Xba*I-RFM-Gruppen (mit mehr als einem Stamm) konnten die Stämme auch nicht mit dem *Sfi*I-Verdau differenziert werden.

Abbildung 4-9: Beispielhafte Darstellung einer *Sfi*I-Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNA von neun *E. coli* O157-Stämmen



Spur 1: "low range" PFGE Marker (0,1 – 200 kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1000 kb), **Spur 2:** 26/22, **Spur 3:** 3873 5/1, **Spur 4:** BU 1464/2, **Spur 5:** BU 1464/3, **Spur 6:** 740, **Spur 7:** E 4884, **Spur 8:** VW Stuhl I, **Spur 9:** 86-62374.96-2, **Spur 10:** 7579/95

Abbildung 4-10: Beispielhafte Darstellung einer *Sfi*I-Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNA von acht *E. coli* O157-Isolaten



Spur 1: "low range" PFGE Marker (0,1 – 200 kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1000 kb), **Spur 2:** 12/1, **Spur3:** HUS 1249, **Spur 4:** 12/5, **Spur 5:** 3873 5/1, **Spur 6:** 12/7, **Spur 7:** 7301/2, **Spur 8:** LM 284/97, **Spur 9:** B569797

4.5 *p*-Gen-Analyse

Das *p*-Gen-Profil eines *E. coli* O157-Stammes zeigt die Anzahl an lambdoiden Bakteriophagen (inklusive *vtx*-Phagen) und deren genomische Positionen an. Innerhalb der hierbei untersuchten 144 *E. coli* O157-Isolate wurden 18 verschiedene *p*-Gen-Profile erkannt (Tabelle 4-8, Abbildungen 4-11 und 4-12). Bei neun *E. coli* O157-Isolaten konnte kein *p*-Gen im Genom nachgewiesen werden; ihnen wurde das Profil XIX zugeordnet.

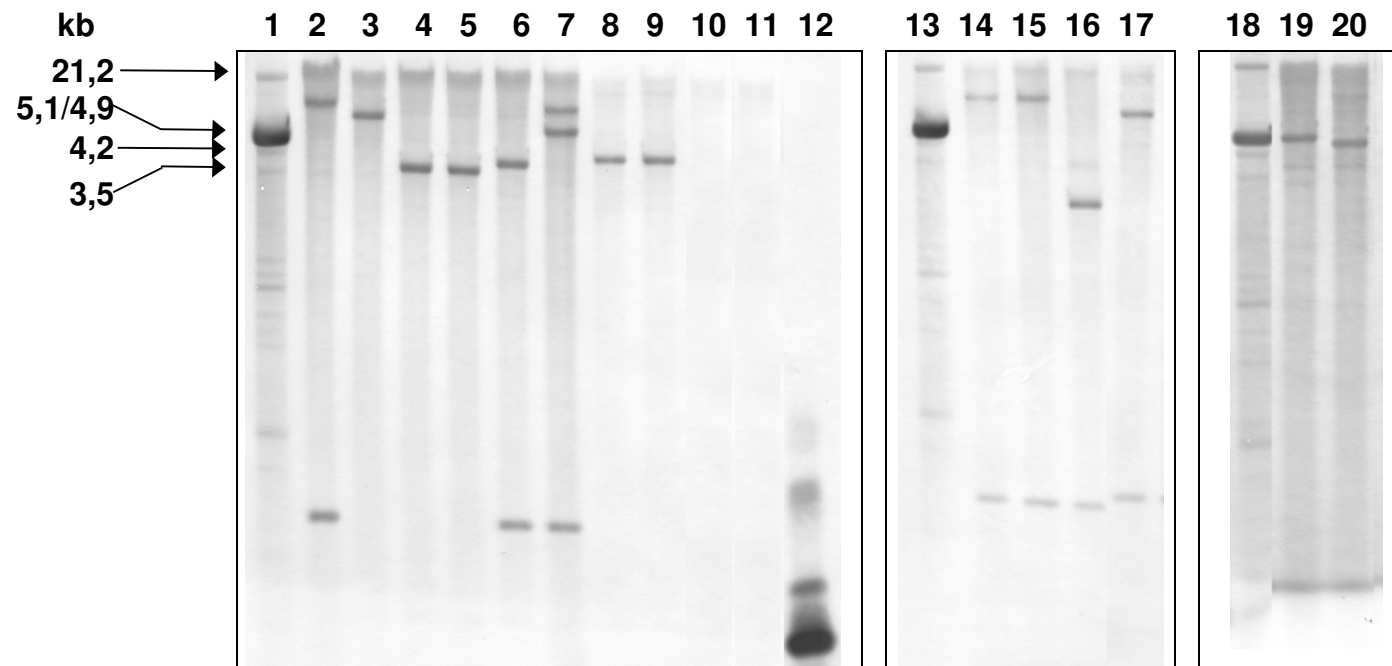
Bei der *p*-Gen-Analyse wurden 145 Stämme untersucht. Die 30 *E. coli* O157-Stämme aus Rinderkot von 23 Tieren einer Mutterkuhherde aus Rudlos (Deutschland) wurden nicht mittels *p*-Gen-Hybridisierung untersucht.

Informationen über die Beziehung zwischen *p*-Gen-Profil, Herkunft und Probenmaterial von 145 (einschließlich Stamm NCTC 12900) mittels *p*-Gen-Analyse untersuchten Stämmen sind in Anhangstabelle 10-5 dargestellt.

Tabelle 4-8: Bandengröße der 19 gefundenen *p*-Gen-Profile

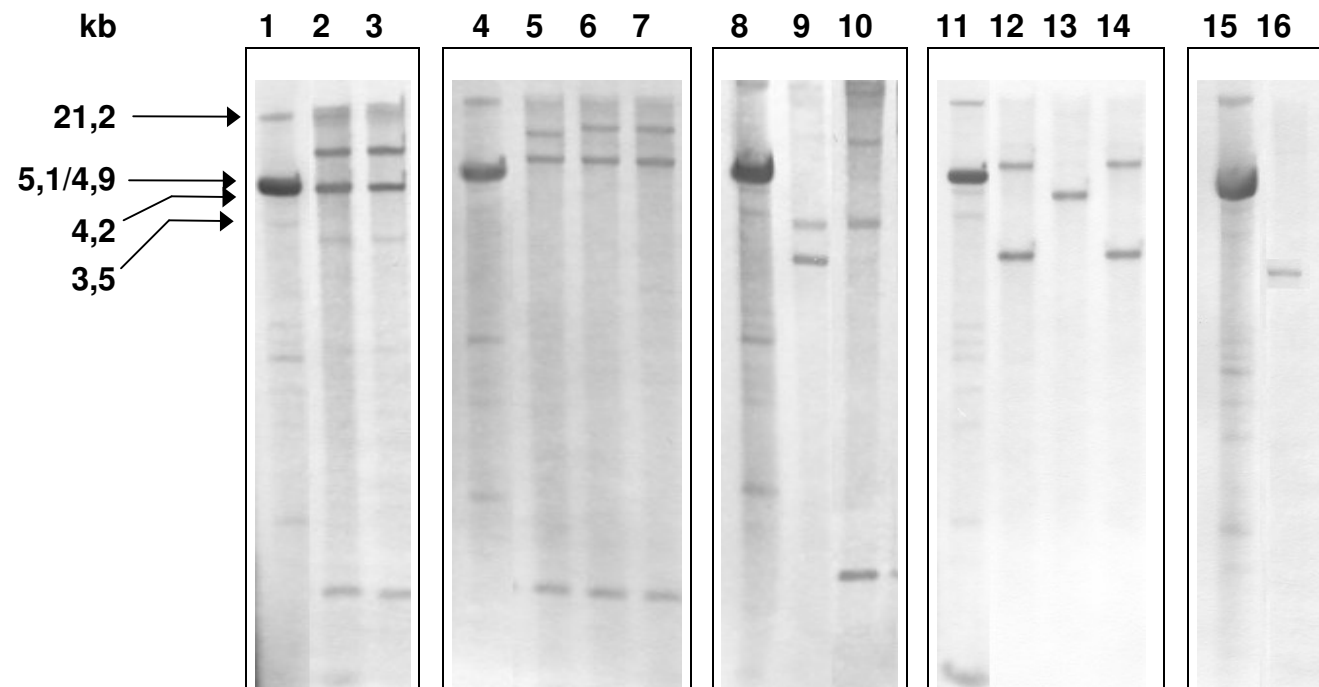
<i>p</i>-Gen-Profil	Größe der Banden
I	4.150 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
II	13.200 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
III	10.000 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
IV	14.000 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
V	3.530 bp
VI	13.150 bp, 4.973 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
VII	4.200 bp
VIII	10.200 bp
IX	13.220 bp, 5.300 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
X	14.100 bp, 5.300 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
XI	2.900 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
XII	3.500 bp, 3.100 bp
XIII	13.180 bp, 3.500 bp und eine Bande kleiner als 564 bp
XIV	8.200 bp und 3.100 bp
XV	3.100 bp
XVI	4.200 bp
XVII	5.148 bp
XVIII	4.973 bp
XIX	keine Bande

Abbildung 4-11: Membran der Southern Blot-Hybridisierung der mit *Eco*RI geschnittenen genomischen DNA von *Escherichia coli* O157-Stämmen mit der *p*-Gen-Sonde. Profile: I, II, III, IV, V, VII VIII, IX, XI, XVII, XVIII und XIX



Spur 1, 13 und 18: DNA-Längenstandard III von Roche; **Spur 2:** 3738/97 – Profil II; **Spur 3:** 3856/97 – Profil VIII; **Spur 4:** 7579/95 – Profil V; **Spur 5:** RL 107/96 – Profil V; **Spur 6:** B 2325 – Profil I; **Spur 7:** NCTC 12080 – Profil IX; **Spur 8:** H1 – Profil VII; **Spur 9:** H4 – Profil VII; **Spur 10:** MG 10/1-00 – Profil XIX (negatives Ergebnis); **Spur 11:** C 600 – negative Kontrolle; **Spur 12:** PCR-Amplifikat von EDL 933 – positive Kontrolle; **Spur 14:** 3978/91 – Profil IV; **Spur 15:** 3232/96 – Profil IV; **Spur 16:** 3010/96 – Profil XI; **Spur 17:** C 7-80 – Profil III; **Spur 19 :** NCTC 12900 – Profil XVII; **Spur 20:** 653 Wieler – Profil XVIII

Abbildung 4-12: Membran der Southern Blot-Hybridisierung der mit *EcoRI* geschnittenen genomischen DNA von *Escherichia coli* O157-Stämmen mit der *p*-Gen-Sonde. Profile: VI, IX, X, XII, XIII, XIV, XV und XVI



Spur 1, 4, 8, 11 und 15: DNA-Längenstandard III von Roche; **Spur 2:** 12/5 – Profil VI; **Spur 3:** HC 2044 – Profil VI; **Spur 5:** 3075/96 – Profil IX; **Spur 6:** 6504/95 – Profil X; **Spur 7:** 6292/95 – Profil X; **Spur 9:** A 9167-1 – Profil XII; **Spur 10:** C 9 KJS – Profil XIII; **Spur 12:** E 214 – Profil XIV; **Spur 13:** E 205 – Profil XVI; **Spur 14:** E 213 – Profil XIV; **Spur 16:** 791/98 – Profil XV

4.6 Zusammenfassende Darstellung

Die Beziehung zwischen den 85 *Xba*I-RFM, dem *p*-Gen-Profil, dem PCR-Ergebnis, der β -D-Glucuronidase-Aktivität und der Sorbit-Fermentierung der 174 untersuchten *E. coli* O157-Stämme wurde analysiert.

Weil mittels *Xba*I-Analyse mehr Unterschiede zwischen den einzelnen *E. coli* O157-Stämmen aufgezeigt werden konnten als mit der *Sfi*I-Analyse, wurde nur erstere mit Gel Compar-Software analysiert und mit der anderen durchgeführten Typisierungsmethode verglichen.

Die Stämme der *Xba*I-RFM-Gruppe A waren Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativ (mit Ausnahme des Stammes 38394/6/1-1, welcher Sorbit-positiv und β -D-Glucuronidase-negativ war) und Verotoxin positiv (mit Ausnahme des Laborstammes NCTC 12900 und des Stammes C 9 KJS, die *vtx*-negativ waren). Innerhalb der Gruppe B waren die Stämme der *Xba*I-RFM B1 bis B6 *vtx*-positiv und diejenigen von B7 bis B22 *vtx*-negativ. Bei Gruppe B wurden sowohl Sorbit-negative und -positive, als auch β -D-Glucuronidase-negative und -positive Stämme gefunden. Weiterhin wurden der Gruppe B (*Xba*I-RFM B1 und B3) die verotoxinogenen Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiven *E. coli* O157:H⁻ zugeordnet.

Bei der Gruppe A wurde beobachtet, dass Stämme mit hohem Dice-Koeffizienten nicht unbedingt identische Verotoxintypen zeigten. Beispielweise zeigten der Stamm W1 aus Patientstuhl (*Xba*I-RFM A59) und der Stamm Sal 4/LXIV/1 aus Rindfleisch (*Xba*I-RFM A3) eine Verwandtschaft von 97,3 % (Dice-Koeffizient mit 1,2 %iger Toleranz), der erstgenannte war nur *vtx*2-positiv, wohingegen der zweite *vtx*2 und *vtx*2c-positiv war. Auch innerhalb der RFM-Gruppen A2, A15, A26 und A37 konnten Stämme mit unterschiedlichem Verotoxintyp gefunden werden.

Um die *p*-Gen-Analyse und die PFGE zu vergleichen, wurden die Dice-Koeffizient-Maxima und -Minima der *Xba*I-Analyse der Stämme jedes einzelnen *p*-Gen-Profiles berechnet (Tabelle 4-9). Diese Rechnung zeigte, dass die Stämme der Profile VII, XVI und XIX einen Dice-Koeffizienten niedriger als 75 % aufwiesen. Das bedeutet, dass sich in diesen Fällen die PFGE als geeigneter für die Differenzierung von *E. coli*

O157-Stämmen erwies als die *p*-Gen-Analyse. Alle anderen Profile besaßen Stämme mit einem Verwandtschafts-Grad von über 75 %. Profil VII besitzt nur *vtx*-negative Stämme ($n = 8$), und nur drei Stämme (Schu1, Schu2 und Schu 3) waren verantwortlich für den minimalen Dice-Koeffizient von $72,6 \pm 3,5$ %, denn die anderen fünf Stämme zeigten einen Verwandtschaftsgrad von 94,4 %. Die Stämme von Profil XVI (Sal 57/4/1-99 und E 205) unterschieden sich auch in der PCR und PFGE, weil Stamm Sal 57/4/1-99 das *vtx2c*-Gen besaß und zum A55-*Xba*I-RFM gehörte; Stamm E 205 besaß demgegenüber kein Verotoxin-Gen und gehört zum *Xba*I-RFM B17. Ähnliches war auch bei Profil XVII zu beobachten, zu welchem der Laborstamm NCTC 12900 und der Stamm 14/SLB zugeordnet wurden. Der Laborstamm NCTC 12900 war *vtx*-negativ und gehörte dem A63- *Xba*I-RFM an; Stamm 14/SLB war *vtx2c*-positiv und wurde dem A60-*Xba*I-RFM zugeordnet. Profil XIV beinhaltete auch zwei nicht-Verotoxin-bildende Stämme (E 214 und E 213) vom *Xba*I-RFM B16. Profil XIII zeigte nur einen Stamm (C 9 KJS) vom *Xba*I-RFM A39, der ebenfalls kein Verotoxinbildner war. Andere Profile wie I, II, III, IV, VI, VIII, IX, X, XI, XII, XVIII besaßen Verotoxin-bildende Stämme, die bei der *Xba*I-Analyse der Gruppe A zugeordnet wurden. Die übrigen Profile V und XV besaßen Stämme, die *vtx*-positiv waren und bei der *Xba*I-Analyse unter die Gruppe B eingruppiert wurden. Zum Profil V gehörten die untersuchten verotoxinogenen Stämme, die β -D-Glucuronidase-positiv und Sorbit-positiv oder –negativ waren und die den *Xba*I-RFM B1 (Stämme aus Stuhl von Patienten: RL 105/96, RL 106/96, RL 107/96, 7579/95 und 1104/96) und *Xba*I-RFM B3 (Stamm 3547/99 aus Pferdekot) zugeordnet wurden. Diese zwei *Xba*I-RFM zeigen eine hohe Verwandtschaft mit 95,2 % (Dice-Koeffizient).

Tabelle 4-9: Beziehung zwischen dem *p*-Gen-Profil, dem *Xba*I-Restriktionsfragmentmuster, sowie dem minimalen und maximalen Dice-Koeffizient der *Xba*I-Analyse der 145 untersuchten *E. coli* O157-Stämme (einschließlich Stamm NCTC 12900)

<i>p</i> -Gen-Profil	Stämme (n) ¹⁾	<i>Xba</i> I-RFM (x) ²⁾	minimaler- maximaler Dice-Koeffizient
I	10	5	89,5 ± 1,5 % - 100 %
II	54	29	80,5 ± 4,2 % - 100 %
III	1	1	100 %
IV	12	7	77,8 ± 2,5 % - 100 %
V	6	2	95,2 % - 100 %
VI	8	5	85,5 ± 2,2 % - 100 %
VII	8	4	72,6 ± 3,5 % - 100 %
VIII	11	6	86,4 ± 3,7 % - 100 %
IX	12	5	83,8 ± 2,1 % - 100 %
X	2	1	100 %
XI	2	2	85,7 %
XII	1	1	100 %
XIII	1	1	100 %
XIV	2	1	100 %
XV	1	1	100 %
XVI	2	2	58,8 %
XVII ³⁾	2	2	88,9 %
XVIII	1	1	100 %
XIX	9	7	59,2 ± 6,8 % 100 %

¹⁾ Anzahl der Stämme

²⁾ Anzahl der *Xba*I-RFM

³⁾ der Labortamm NCTC 12900 gehört zu diesem Profil

Mit der PFGE mit *Xba*I-Verdau konnten die Stämme in mehr RFM als mit der *p*-Gen-Analyse unterteilt werden. Das bedeutet, dass die untersuchten Stämme mit der PFGE besser differenziert werden konnten. Trotzdem wurden bei drei *Xba*I-RFM (A4, A10 und A15) unterschiedliche *p*-Gen-Profile gefunden.

Die Ergebnisse der Beziehung zwischen den 85 *Xba*I-RFM, dem *p*-Gen-Profil, dem PCR-Ergebnis, der β -D-Glucuronidase-Aktivität und der Sorbit-Fermentierung der 174 untersuchten *E. coli* O157-Stämme wird in Anhangstabelle 10-6 gezeigt.

Die Beziehung zwischen den 85 *Xba*I-RFM aller 174 untersuchten *E. coli* O157-Stämme und dem *p*-Gen-Profil sind in (Anhangstabelle 10-1, 10-2, 10-3 und 10-4) gezeigt.

5 DISKUSSION

Unter den Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) haben die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) einen besonderen Stellenwert, da sie beim Menschen für die Auslösung des Hämolytisch-urämisches-Syndroms (HUS) sowie der Hämorrhagischen Colitis (HC) verantwortlich sind. Diese Krankheiten beruhen auf der Ausprägung der bekannten Virulenzfaktoren Verotoxin, EHEC-Hämolysin und Intimin, dem Produkt des *eae*-Gens (NATARO und KAPER, 1998). Der Serovar O157:H7, der beim Menschen sehr häufig für schwerwiegende Krankheitsverläufe verantwortlich ist (PATON und PATON, 1998), wurde zwar auch beim Rind isoliert, spielt jedoch als Krankheitserreger bei diesen Tieren allenfalls eine untergeordnete Rolle (GRIFFIN und TAUXE, 1991). Auch kleine Wiederkäuer wie Schafe und Ziegen stellen ein Reservoir für *E. coli* O157 dar (CHAPMAN et al., 1997 und HEUVELINK et al., 1998a).

Die aus Deutschland vorgelegten Ergebnisse epidemiologischer Erhebungen zeigen, dass die größte Infektionsgefahr offensichtlich vom direkten Tierkontakt ausgeht. An zweiter Stelle im Infektionsgeschehen rangiert der EHEC-ausscheidende Mensch; erst an letzter Stelle sind die Lebensmittel tierischen Ursprung gelistet (HUBER et al., 1998). Das soll nicht Anlass zur Beruhigung sein, denn mit O157 werden – allerdings äußerst selten – grundsätzlich als hochvirulent einzustufende *E. coli*-Stämme in Lebensmitteln gefunden (BÜLTE, 2001). Diese Infektionsgefahr geht auch aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung hervor: Bei *E. coli*-Stämmen aus Stuhl erkrankter Patienten oder asymptomatischer Ausscheider, aus Rinderkot und bei Lebensmittel-Isolaten gelang der Nachweis von *vtx1*, *vtx2* und *vtx2c*; ein Pferdekot-Isolat erwies sich ebenfalls als positiv für *vtx2*.

Bemerkenswert sind die Angaben von ALLERBERGER et al. (2000), dass auch nicht-Verotoxin-bildende *E. coli* O157 Erkrankungen beim Menschen verursachen können. Die vorliegenden Ergebnisse erbrachten auch den Nachweis solcher nicht-verotoxinogener *E. coli* O157 aus Rinderkot, Pferdekot, Hundekot und Lebensmittel.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, DNA verschiedener *E. coli* O157-Isolate zu typisieren und zu vergleichen. Mittels PFGE konnte ein großer Teil dieses Ziels erreicht werden. Bereits mehrfach konnte ein DNA-Fingerprinting durch PFGE wichtige Beiträge zur Aufklärung epidemiologische Zusammenhänge bei *E. coli* O157-Isolaten leisten (ALLERBERGER et al., 2000; ALLISON et al., 1998; ALLISON et al., 2000; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001; BÖHM und KARCH, 1992; COBBOLD und DESMARCHELIER, 2001; FEGAN und DESMARCHELIER., 2002; HEUVELINK et al., 1998a; HEUVELINK et al., 2002; IZUMIYA et al., 1997; JOHNSEN et al., 2001; JOHNSON et al., 1995; WELINDER-OLSSON et al., 2000).

Die Identifizierung von Stämmen, die zu einem Klon gehören, ist eine wichtige Aufgabe der Infektionsepidemiologie. TENOVER et al. (1995) sowie GOERING (1998) berichteten, dass das entstandene RFM den Genotyp eines Bakterienstammes definiert. Miteinander verwandte Stämme einer Spezies werden anhand ihrer Ähnlichkeit im RFM erkannt. Der quantitative RFM-Vergleich erlaubt eine Definition von „Klon“ und „klonale Variante“ innerhalb einer Spezies. Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind selektionsneutrale Marker, die im Verlauf der Evolution des Bakterienchromosoms über „Rearrangements“ oder Mutationen an einer Stelle des Genoms verloren gehen und an anderer Stelle neu entstehen können. Die nicht miteinander verwandten Klone einer Spezies zeichnen sich durch unterschiedliche RFM aus, während die Varianten eines Klons sehr ähnliche oder identische RFM besitzen.

GOERING (1998) erklärte die verschiedenen genetischen Ereignisse, die auf das Genom einwirken können (Abbildung 5-1).

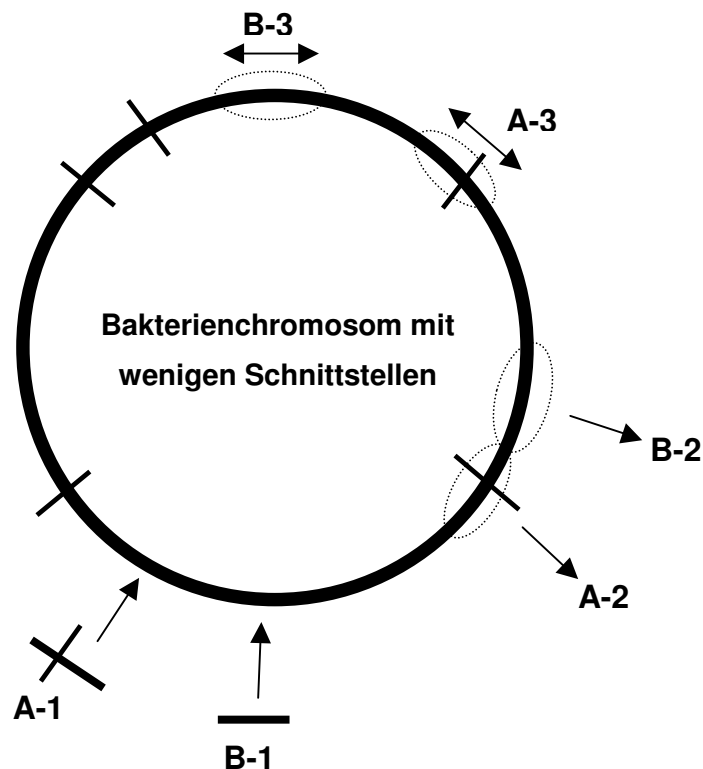


Abbildung 5-1: Überblick über verschiedene chromosomale genetische Ereignisse. Darstellung von Insertionen (A-1, B-1), Deletionen (A-2, B-2) und „Rearrangements“ (A-3, B-3) unter stattfindender (jeweils A) oder ausbleibender Einflussnahme (jeweils B) auf eine Restriktionsstelle im Genom; nach GOERING, 1998.

In einer weiteren Abbildung (Abbildung 5-2) interpretierte GOERING (1998) die nach Einwirkung dieser genetischen Ereignisse entstandenen RFM. Im Vergleich zu dem in der Mitte der Abbildung 5-2 gezeigten epidemiologischen verantwortlichen Referenzmuster üben die unter A-1 bis A-3 aufgeführten genetischen Ereignisse durch eine Veränderung einer Schnittstelle des Genoms einen Einfluss auf das RFM aus. Die unter B-1 und B-2 dargestellten genetischen Ereignisse haben zwar keinen Einfluss auf die Schnittstellen, bewirken jedoch durch Einfügen bzw. durch Entfernen von DNA-Abschnitten eine Änderung im RFM, während das unter B-3

Form von Dendogrammen. RÖMLING et al. (1995) stellten fest, dass, wenn alle Stämme auf einem einzigen Gel analysiert werden können, der visuelle Vergleich der Fragmentlängenmuster in der Regel ausreicht. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Vergleich von Mustern verschiedener Gele benötigt. Deshalb wurde die visuelle Analyse und die Analyse mittels „Gel Compar-Software“ in Kombination durchgeführt.

Diese Methode und die sich daran anschließende Zuordnung der einzelnen Isolate zu einem RFM wurde in der Folge von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgenommen. Jedoch ließen sich bei der Interpretation der erhaltenen RFM durchaus Unterschiede feststellen. So ließen KRAUSE et al. (1996) eine Abweichung beim Matching der Fragmente untereinander von maximal zwei Prozent bei der Auswertung zu. Stämme mit einer „similarity matrix“ von mehr als 95 % werteten sie als identisch. Dies zeigt beispielhaft die Unterschiede in der Wertung der erhaltenen Ergebnisse. Auch wenn die Standardisierung der PFGE als „Fingerprint-Methode“ bereits weit fortgeschritten ist, so scheinen doch z. T. erhebliche Unterschiede in der Interpretation zu bestehen. BÖHM und KARCH (1992) werteten, wie auch andere Arbeitsgruppen, zwei Isolate als nicht zum gleichen Klon gehörend, wenn sie sich in zwei oder mehr Fragmenten unterscheiden. TENOVER et al. (1995) bewerten die Verwandtschaftsverhältnisse von Stämmen anhand des unterschiedlichen Auftretens der Fragmente bei den Isolaten. Erst ab dem Vorliegen von mehr als sieben Fragmenten, die nicht bei beiden Stämmen auftreten, werten sie diese Stämme als nicht miteinander verwandt. Basierend auf TENOVER et al. (1995) bewerten KARIURI et al. (1999) Stämme mit einer „similarity matrix“ von mehr als 60 % als „possibly closely related“ (wahrscheinlich eng verwandt). Nach GUTH et al. (2003) sind die Stämme als „possibly closely related“ klassifiziert, wenn sie eine „similarity matrix“ von ≥ 80 % zeigen. Andererseits behaupten WILLSHAW et al. (2001), dass die Interpretation der PFGE-Fragmentmuster noch subjektiv und die Differenzierungskriterien von TENOVER et al. (1995) vielleicht nicht für EHEC O157-Stämme geeignet sind. Wie bereits erwähnt, wurde in den eigenen Untersuchungen die Auswertung der PFGE-Ergebnisse durch „Gel Compar-Software“ und visuelle Analyse durchgeführt. Durch die Analyse des Dendogramms und die visuelle Auswertung zusammen mit den Ergebnissen der Typisierung der Verotoxin-Gene, biochemischer Tests und der Serotypisierung konnten die Stämme in Klone und klonale Varianten unterschieden werden.

In den vorliegenden Ergebnissen zeigen diejenigen *E. coli* O157 (darunter Referenzstamm EDL 933), die durch die visuelle Analyse der RFM-Gruppe A zugeordnet werden konnten, einen hohen Dice-Koeffizienten ($76,7 \pm 5,3\%$). Das bedeutet, dass sich diese Stämme nur in wenigen Banden unterschieden. Zwischen diesen Stämmen zeigen sich wenige genetische Ereignisse, wie Insertion, Deletion und „rearrangement“, und sie gehören zum gleich Klon oder sind klonale Varianten.

BÖHM und KARCH (1992) fanden bei *E. coli* O157:H7 jeweils fünf identische Banden im Bereich zwischen 220 und 300 kb. Zwei Stämme bildeten hiervon jedoch eine Ausnahme, da sie jeweils sechs Banden in diesem Bereich zeigten. In eigenen Untersuchungen wurden abweichende Resultate erhalten: *E. coli* O157:H7 können drei, vier oder fünf Banden im Bereich zwischen 218 und 295 kb zeigen; in der Tat sind es jedoch in der Mehrzahl der Fälle fünf Banden. Noch im Bereich zwischen 25 und 73 kb wurden typische Banden gefunden. Eine Ausnahme bilden die untersuchten *E. coli* O157:H7-Isolate aus Rinderkot von Tieren einer Mutterkuhherde aus Rudlos: Diese zeigten unter anderem sechs Banden zwischen 220 und 300 kb (die zusätzliche Bande lag bei ca. 215 kb), eine fehlende Bande zwischen 25 und 73 kb, jedoch eine zusätzliche Bande mit 320 kb. Trotz dieser Unterschiede wiesen sie noch einen hohen Dice-Koeffizienten mit EDL 933 auf (von 75 % bis 78,9 %). Teilweise stimmen die vorliegenden Ergebnisse jedoch mit denen von BÖHM und KARCH (1992) überein: Die *Xba*I-RFM-Analyse der typischen Banden erlaubt die Vermutung, dass es sich um *E. coli* O157:H7 handelt, ohne die Durchführung von O- und H-Serotypisierung und Verotoxintypisierung.

Die Untersuchung der Banden zwischen 25 und 73 kb kann durch Veränderung von Pulszeiten und –dauer unter Beibehaltung des Enzyms *Xba*I verbessert werden. MURASE et al. (1999) empfiehlt für die Trennung von Fragmenten, die kleiner als 100 kb sind, eine konstante Pulszeit von 4 s für 20 h.

KARCH et al. (1993) behaupten, dass Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positive verotoxinogene *E. coli* O157:H⁻ ein identisches oder eng verwandtes *Xba*I-RFM besitzen, das sich deutlich von dem andere *E. coli*-Stämme unterscheidet. Im Gegensatz dazu zeigten die Sorbit-negativen und β -D-Glucuronidase-positiven verotoxinogenen *E. coli* O157:H⁻ in den eigenen Untersuchungen das gleiche *Xba*I-

RFM wie die Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiven verotoxinogenen *E. coli* O157:H⁻ (z. B. Stämme 7579/95 und RL 105/96). Aber wie schon gezeigt, unterscheiden sich diese Stämme von Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativen verotoxinogenen *E. coli* O157-Stämmen.

Hier muss eingeräumt werden, dass es sich bei den benutzten Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sfi*I um sog. „Rare-cutter“ handelt, die eine 6 Basen bzw. 13 Basen lange und damit relativ seltene Sequenz erkennen. Geringfügige Veränderung im Bakteriengenom außerhalb dieser Erkennungssequenzen führen nicht automatisch zu Veränderungen im Restriktionsmuster. Wie HARSONO et al. (1993) anhand von *E. coli* O157:H7 zeigten, können bei Anwendungen dieser zwei Enzyme diese Mutationen unter Umständen jedoch aufgedeckt werden. Bei unserer Arbeit wurde auch beobachtet, dass *Xba*I potentiell nützlicher für die Aufdeckung solcher Variabilitäten ist als *Sfi*I. Das wurde z. B. durch die RFM-Ergebnisse der Stämme BU 1464/2 und BU 1464/3 demonstriert. Sie zeigen Unterschiede bei der *Xba*I-Analyse, wohingegen sie bei *Sfi*I zum gleichen RFM gehören. Andererseits konnte in den eigenen Untersuchungen, wie auch bereits von HARSONO beobachtet, *Sfi*I eine Variabilität aufzeigen, die mit Hilfe von *Xba*I nicht entdeckt werden konnte. Beispielsweise zeigen Stämme des *Xba*I-RFM A4 zwei unterschiedliche *Sfi*I-RFM. Dennoch stehen HARSONOS Ergebnisse nicht im Widerspruch zur Klonalitätstheorie, sondern untermauern bei näherer Betrachtung diese These: Die ermittelten genomischen Unterschiede waren gering. Dies zeigte sich in Form von sehr ähnlichen Restriktionsmustern. Andererseits verwendeten RICE et al. (1999a) ebenfalls zwei Enzyme; sie behaupten, dass die Benutzung eines einzigen Enzyms zur Determinierung der Verwandtschaft zwischen *E. coli* O157 nicht ausreicht.

Die PFGE ist in der Lage, u. U. auch bei hoher genetischer Ähnlichkeit Unterschiede im Bakteriengenom aufzudecken. Jedoch wird diese Fähigkeit gerade bei Erregern klonalen Ursprungs eingeschränkt und durch einen extrem hohen finanziellen, zeitlichen und personellen Aufwand beim Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen erkaufte. So wäre ein Nachweis bestehender Mutationen zwar theoretisch möglich, jedoch nicht in jedem Fall, da stets nur Mutationen an der Enzymerkennungssequenz detektiert werden.

Wie schon in Abbildung 5-2 gezeigt wurde, führt die Deletion einer Base an der spezifischen Erkennungsstelle des Restriktionsenzym zum Verlust einer Schnittstelle: Zwei Fragmente bleiben zu einem größerem Fragment vereint. Entsteht durch Mutation eine neue Enzymerkennungsstelle, so kann das Restriktionsenzym dort schneiden: Ein Fragment wird in zwei kleinere geteilt. Findet eine Mutation hingegen im übrigen, weitaus größeren Genom statt, verändert sich das RFM nicht, und die Mutation kann nicht detektiert werden.

Ein anderer Nachteil der PFGE ist, dass manche Isolate nicht typisierbar sind. Bei fünf Isolaten trat dieses Problem auf (Daten nicht gezeigt). Das gleiche Problem wurde auch von anderen Autoren geschildert (IZUMIYA et al., 1997).

Als weiteres Problem fiel die Reproduzierbarkeit (Variabilität) der PFGE auf. Bei wiederholter Durchführung der PFGE des Stammes HC 2044 wurde nach Subkultivierung eine Bande weniger im RFM beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen wurde von IGUCHI et al. (2002) näher untersucht. Sie behaupten jedoch, dass trotz RFM-Veränderung die epidemiologisches „Lineage“ nicht zunichte gemacht werde. Andere Autoren haben dieses Phänomen ebenfalls beobachtet (BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001; LIESEGANG et al., 2000).

Trotz aller geäußelter Kritikpunkte gegenüber der PFGE stellt sie dennoch ein wertvolles Werkzeug zur Charakterisierung von Mikroorganismen und deren epidemiologischer Klassifizierung dar. Sie wird inzwischen als Standardmethode der Typisierung von *E. coli* O157 bezeichnet (IZUMIYA et al., 1997) und als beste Methode zur EHEC O157-Differenzierung klassifiziert (WILLSHAW et al., 2001).

Mit den Ergebnissen dieser PFGE-Analyse konnte bewiesen werden, was auch andere Autoren schon gezeigt haben: Der gleiche *E. coli* O157-Klon (identische oder ähnliche RFM) kann in verschiedenen Ländern gefunden werden. AKIBA et al. (2000) fanden sehr ähnliche Isolate in Rinderherden in den USA und in Japan. KESKIMÄKI et al. (1998) behauptete, dass ein einziger VTEC-Klon in viele Regionen Europas expandiert ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Isolate, die ähnliche oder identische RFM aufweisen, aus verschiedenen Ländern (USA,

Deutschland [verschiedene Regionen], Kanada, Dänemark, Schottland und Polen) stammen.

Zur Bestätigung, dass Wiederkäuer als Reservoir von EHEC O157-Stämmen anzusehen sind und dass ein aus Rinderkot stammendes Isolat durch fehlende Hygiene-Maßnahmen Lebensmittel kontaminieren kann und dadurch Menschen erkranken können, wurde der gleiche Klon (identische *Xba*I-RFM – *Xba*I-RFM A2) in Rinderkot (Stamm B 2482), in Lebensmitteln (Stamm D1 und BU 1464/3) und in Stuhl (Stamm 12/4) isoliert. Andere *Xba*I-RFM (RFM A4, A23, A34 und A37) wurden ebenfalls bei Isolaten aus Lebensmittel und Stuhl gefunden. Alle diese Befunden bestätigen, was auch andere Autoren schon gezeigt haben. LAHTI et al. (2001) hat identische RFM bei Stuhl- und Rinderkotisolaten gefunden, was die Vermutung stützt, dass Humaninfektionen durch bovine *E. coli* O157 hervorgerufen werden können. FEGAN und DEMARCHELIER (2002) bestätigten ebenfalls anhand von PFGE-Ergebnissen die Übertragung von *E. coli* O157 zwischen Menschen und Rindern. BARKOCY-GALLAGHER et al. (2001) zeigten durch PFGE-Ergebnisse, dass Rinderschlachtierkörper durch Rinderkot der gleichen Charge kontaminiert werden.

Aus der Stuhlprobe eines Mitarbeiter eines fleischverarbeitenden Betriebes konnten vier verschiedene Stämme isoliert werden (Stamm 12/1, 12/4, 12/5 und 12/7). Sie weisen jedoch verschiedene *Xba*I-RFM auf und unterscheiden sich auch in der VT-Typisierung. Stamm 12/4 ist *vtx1*- und *vtx2c*-positiv, die Stämme 12/1, 12/5 und 12/7 sind *vtx1*- und *vtx2*-positiv. Ähnliches wurde auch bei den Kotproben dreier Tiere einer Mutterkuhherde festgestellt, allerdings nur im Hinblick auf Unterschiede in der PFGE. Das ließe sich entweder mit dem Phänomen des „clonal turnover“ erklären, das durch Mutation, "rearrangements" innerhalb des Genoms oder Verlust bzw. Gewinn von Plasmiden entsteht, oder es gab eine Reinfektion oder eine doppelte Infektion (AKIBA et al., 2000; KARCH et al., 1995).

Die Behauptung von BÖHM und KARCH (1992), dass die PFGE zwischen verotoxin-positiven und verotoxin-negativen *E. coli* O157 (u. A. O157:H3, O157:H12, O157:16 und O157:H38) differenzieren könne konnte, abgesehen von zwei Ausnahmen, auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Die beiden VT-negativen Stämme NCTC 12900 und C 9 KJS weisen einen hohen Dice-Koeffizienten mit

Verotoxin-produzierenden *E. coli* O157 auf. Der Stamm NCTC 12900 gehört auch in der *p*-Gen-Analyse zum gleichen Profil (XVII) wie ein *vtx2c*-positives Isolat (Stamm 14/SLB). Die nicht-verotoxinogenen *E. coli* O157 gehören nicht zum gleichen Klon wie die verotoxinogenen *E. coli* O157.

Zum Stamm NCTC 12900 sollte noch ergänzt werden, dass er vermutlich einen hohen Dice-Koeffizienten mit Verotoxin-produzierenden *E. coli* O157 zeigte, weil er ein *E. coli* O157:H7 Stamm ist, der die Eigenschaft der Verotoxinbildung verloren hat (SKANDAMIS und NYCHAS, 2000).

Denkbar ist außerdem eine geringfügige Veränderung des RFM durch unterschiedliche Phagen und Phagenintegrationsorte sowie durch Variationen im Profil der beherbergten Plasmide. Diesen Ansatz versuchen SAMADPOUR et al. (1993) zu verwirklichen. Sie hybridisierten restringierte *E. coli* O157:H7-DNA mit λ -Bakteriophagensonden und konnten so Stämme verschiedener Ausbrüche unterscheiden, jedoch ohne eine Aussage über das eigentliche Bakteriengenom zu treffen. Später entwickelte DATZ et al. (1996) die *p*-Gen-Typisierung. Das *p*-Gen des VT2-konvertierten Phagen 933W von *E. coli* O157 Stamm EDL 933 ist 702 bp groß und besitzt eine 95,3 %ige Sequenz-Homologie mit dem *p*-Gen des λ -Phagen, was verdeutlicht, dass O157-Phagen Mitglieder der lambdoiden Bakteriophagenfamilie sind. Mittels DNA-Hybridisierung der *E. coli* O157-Stämme mit *p*-Gen-Sonden konnte die Anzahl von λ -Phagen (einschließlich *vtx*-Phagen) und deren Positionen im Genom dieser *E. coli* O157-Stämme bestimmt werden.

Gemäß LIESEGANG et al. (2000) stellt die Typisierung von *E. coli* O157 mittels PFGE in Kombination mit der *p*-Gen-Typisierung ein Laborwerkzeug für die erweiterte epidemiologische Überwachung von *E. coli* O157:H7/H⁻ dar.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die *p*-Gen-Typisierung zur Differenzierung von *E. coli* O157-Stämmen nicht so gut geeignet ist wie die PFGE; allerdings konnte diese Methode VT-positive von den VT-negativen Stämmen (Ausnahme: NCTC 12900 und E 205), die Sorbit-positiven oder Sorbit-negativen und β -D-Glucuronidase-positiven Verotoxin-bildenden *E. coli* O157:H⁻-Stämme von den Sorbit-negativen und β -D-Glucuronidase-negativen Verotoxin-bildenden *E. coli* O157,

sowie die *E. coli* O157 mit typischen PFGE-Banden von den *E. coli* O157 ohne typische Banden (Ausnahme: Stamm NCTC 12900) unterscheiden.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von LIESEGANG et al. (2000) überein. Sie konnten ebenfalls Sorbit-fermentierende und β -D-Glucuronidase-positive *E. coli* O157 von der Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativen *E. coli* O157 mittels *p*-Gen-Typisierung differenzieren.

Die nicht-Verotoxin-bildenden *E. coli* O157-Stämme, die ein *p*-Gen-Profil zeigten (z. B. Profil VII und XIV), konnten durch die Ergebnisse von DATZ et al. (1996) erklärt werden. Sie bewiesen, dass alle O157-Isolate ein analoges λ -Gen *p*, das nicht in Verbindung mit *vtx1* und *vtx2* steht, besitzen. Er arbeitete nur mit verotoxinogenen *E. coli* O157. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass nicht-verotoxinogene *E. coli* O157-Stämme nicht immer ein *p*-Gen besitzen, d. h. dass diese Stämme keinen λ -Phagen in ihrem Genom besitzen.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, wiesen einige genotypisch identische Stämme verschiedene Serotypen auf; manche gehören zu *E. coli* O157:H7, andere zu O157:H⁻. Dieser Widerspruch wurde z. B. zwischen den Stämmen B2482 und D1 sowie den Stämmen 740, R4, 654, 730 und 1204 bemerkt. Das konnten FIELDS et al. (1997) erklären: Durch wiederholte Subkultivierungen kann ein Stamm, der ursprünglich beweglich war, seine Kapazität zur Expression des *fliC*-Gens, das für die H-Antigen-Kodierung verantwortlich ist, verlieren. Dann stellen sich H7-Stämme bei der Serotypisierung phänotypisch als unbeweglich dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde dann gezeigt, dass Verotoxintypisierung, RFLP mit *p*-Gen als Sonde und PFGE als Genotypisierungsschemata in Kombination mit klassischer Erregertypisierung, wie Sero- und Phänotypisierung, eine gute Methode ist, um *E. coli* O157-Stämme unterschiedlicher Herkunft zu charakterisieren.

6 SCHLUßFOLGERUNGEN

Trotz aller geäußelter Kritikpunkte gegenüber der PFGE stellt sie dennoch ein wertvolles Werkzeug zur Charakterisierung von Mikroorganismen und deren epidemiologischer Charakterisierung dar.

Mittels *Xba*I-Analyse konnten mehr Unterschiede zwischen den einzelnen *E. coli* O157-Stämmen aufgezeigt werden als mit der *Sfi*I-Analyse.

E. coli O157:H7-Stämme können in der PFGE bei Verdau mit *Xba*I drei, vier oder fünf (Mehrzahl der Fälle) Banden (mit geringer Ausnahme) im Bereich zwischen 218 und 295 kb zeigen. Auch im Bereich zwischen 25 und 73 kb wurden typische Banden gefunden.

Mit den eigenen Ergebnissen der PFGE-Analyse konnte gezeigt werden, dass identische Klone (identische oder ähnliche *Xba*I-RFM) von *E. coli* O157 in verschiedenen Ländern gefunden werden können. Gleichfalls konnten fünf *Xba*I-RFM bei Stämmen aus unterschiedlichen Habitaten (Stuhl, Lebensmittel und Kot) gefunden werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die *p*-Gen-Typisierung zur Differenzierung von *E. coli* O157-Stämmen nicht so gut geeignet ist wie die PFGE, weil mit der PFGE mit *Xba*I-Verdau die Stämme in mehr RFM als mit der *p*-Gen-Analyse unterteilt werden konnten. Allerdings gelang mit beiden Methoden eine Unterteilung der *E. coli* O157-Stämme in distinkte Gruppen: eine verotoxinogene, Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negative *E. coli* O157-Gruppe; eine verotoxinogene, Sorbit-positive oder Sorbit-negative und β -D-Glucuronidase-positiven *E. coli* O157-Gruppe; und nicht verotoxinogene *E. coli* O157-Gruppen.

Verotoxintypisierung, RFLP mit *p*-Gen als Sonde und PFGE als Genotypisierungsschemata in Kombination mit klassischer Erregertypisierung, wie Sero- und Phänotypisierung, sind empfehlenswerte Methoden, um *E. coli* O157-Stämme unterschiedlicher Herkunft zu charakterisieren.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Enterohämorrhagische *E. coli*, vertreten durch die Serogruppe O157, stellen als Erreger hämorrhagischer Diarrhöen und des Hämolytisch-urämisches Syndroms eine erst seit 1982 bekannte Gruppe darmpathogener *E. coli* dar. Neben weiteren charakteristischen Virulenzfaktoren besitzen sie die Fähigkeit zur Bildung von Verotoxinen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 174 *E. coli* O157-Stämme der Sammlung des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (Justus-Liebig-Universität Giessen) mittels biochemischer und genotypischer Methoden wie Polymerasekettenreaktion für die Verotoxintypisierung und Pulsfeldgelelektrophorese (mit *Xba*I und *Sfi*I) untersucht. 144 *E. coli* O157-Stämme wurden zusätzlich mittels Southern-Blot Hybridisierung mit *p*-Gen Sonde untersucht. Weiterhin wurden die β -D-Glucuronidase-Reaktion sowie die Sorbitverwertung als phänotypische Parameter berücksichtigt.

Die Stämme wurden aus Stuhl (n = 82), Lebensmitteln (n = 41), Rinderkot (n = 42), Pferdekot (n = 6), Kälberkot (n = 2) und Hundekot (n = 1) isoliert und stammten aus verschiedenen Instituten und Regionen. Der Referenzstamm *E. coli* NCTC 12900 wurde ebenfalls einbezogen.

141 der 174 getesteten *E. coli* O157-Isolate erwiesen sich nach 18stündiger Bebrütung auf dem Hämorrhagische Colitis-Medium als Sorbit-negativ. 128 dieser Stämme wiesen ferner keine β -D-Glucuronidase-Aktivität auf. Von den 33 Sorbit-positiven Stämmen konnte bei 32 Stämmen eine β -D-Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Bei der Verotoxintypisierung der 174 untersuchten Stämme erwiesen sich ein Stamm (0,6 %) als *vtx1*-positiv, 36 Stämme (20,7 %) als *vtx2*-positiv, 29 (16,7 %) als *vtx2c*-positiv, 24 (13,8 %) als gleichzeitig *vtx2*- und *vtx2c*-positiv, drei (1,7 %) gleichzeitig *vtx1*-, *vtx2*- und *vtx2c*-positiv, neun (5,2 %) als gleichzeitig *vtx1*- und *vtx2c*-positiv, 32

(18,4 %) als gleichzeitig *vtx1*- und *vtx2*-positiv sowie 40 Stämme (22,9 %) als *vtx*-negativ.

Zwischen allen 175 (einschließlich Stamm NCTC 12900) untersuchten *E. coli* O157-Stämmen konnte mittels PFGE bei Verdau mit *Xba*I eine Verwandtschaft von $53,4 \pm 6,4$ % gefunden werden (Dice-Koeffizient mit 1,2%iger Toleranz). Insgesamt wurden 85 *Xba*I-Restriktionsfragmentmuster (RFM) gefunden. Die Analyse des *Sfi*I Makrorestriktionsmuster in der PFGE erwies sich als weniger gut geeignet zur Differenzierung von *E. coli* O157-Stämmen.

Innerhalb der 145 (einschließlich Stamm NCTC 12900) mittels *p*-Gen Analyse untersuchten *E. coli* O157-Isolate wurden 18 verschiedene *p*-Gen-Profile erkannt.

Mit den eigenen Ergebnissen der PFGE-Analyse konnte gezeigt werden, dass identische Klone (identische oder ähnliche *Xba*I-RFM) von *E. coli* O157 in verschiedenen Ländern (Dänemark, Kanada, Schottland, den USA und verschiedenen Regionen von Deutschland) gefunden werden können. Gleichfalls konnten fünf *Xba*I-RFM bei Stämmen aus unterschiedlichen Habitaten (Stuhl, Lebensmittel und Kot) gefunden werden.

Mit der PFGE gelang es, die einbezogenen *E. coli* O157-Stämme in distinkte Klone zu unterteilen. Die erste Gruppe umfasste verotoxinogene, Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negative *E. coli* O157-Stämme ($n = 129$; Stämme von *Xba*I-RFM der Gruppe A und verotoxinogene-Stämme von Tieren einer Mutterkuhherde mit *Xba*I-RFM B4, B5 und B6). Eine zweite Gruppe setzte sich aus verotoxinogenen, Sorbit-positiven oder -negativen und β -D-Glucuronidase-positiven *E. coli* O157-Stämmen ($n = 6$, *Xba*I-RFM B1 und B3) zusammen. Die letzte Gruppe bildeten nicht verotoxinogene, β -D-Glucuronidase-positive und Sorbit-positive oder -negative *E. coli* O157-Stämme mit niedrigem Verwandtschaftsgrad ($n = 39$).

Die PFGE ist laut Literatur eine gute Methode zur Feintypisierung und wurde bereits häufig für diesen Zweck eingesetzt. In der eigenen Arbeit zeigte sich, dass die *p*-Gen-Analyse dazu geeignet ist, zwischen Isolaten zu differenzieren, die einen sehr

hohen oder identischen Dice-Koeffizienten aufweisen und ein ähnliches oder identisches Virulenzprofil zeigen.

Die PFGE stellt mit Ergänzung von Serotypisierung, biochemischer Analyse, Verotoxintypisierung und *p*-Gen-Analyse ein wertvolles epidemiologisches Werkzeug zur Typisierung von *E. coli* O157-Stämmen dar.

8 SUMMARY

Since 1982 enterohemorrhagic *E. coli*, represented by the serogroup O157, has been considered the pathogen from the group of intestinal pathogenic *E. coli* that causes hemorrhagic diarrhoea and hemolytic-uremic syndrome. Amongst other virulence factors, it possesses the capacity to form verotoxin.

In this work, 174 strains from the collection of the Institute of Veterinary Food Science (Justus-Liebig-Universität Giessen) were analysed using biochemical and genotypic methods, such as polymerase chain reaction for the verotoxintyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (with *Xba*I and *Sfi*I restriction). 144 of 174 *E. coli* strains were additionally analysed using Southern-blot hybridisation with *p*-gene probe. Furthermore, the β -D-glucuronidase-reaction and the sorbitol fermentation were used as phenotypic parameters.

The strains were isolated from human faeces (n = 82), food (n = 41), bovine faeces (n = 42), equine faeces (n = 6), calf faeces (n = 2) and canine faeces (n = 1) in different institutes and regions. The reference strain *E. coli* NCTC 12900 was also included.

141 of the 174 *E. coli* strains analysed after 18 hours cultivation on hemorrhagic colitis-medium were found to be sorbitol-negative. 128 of these strains didn't exhibit β -glucuronidase activity. In 32 of the 33 sorbitol-positive strains, β -D-glucuronidase activity was detected.

In the verotoxintyping of the 174 strains analysed, one strain (0,6 %) was found to be *vtx1*-positive, 36 strains (20,7 %) were *vtx2*-positive, 29 (16,7 %) were *vtx2c*-positive, 24 (13,8 %) were simultaneously *vtx2*- and *vtx2c*-positive, three (1,7 %) were simultaneously *vtx1*-, *vtx2*- and *vtx2c*-positive, nine (5,2 %) were simultaneously *vtx1*- and *vtx2c*-positive, 32 (18,4 %) were simultaneously *vtx1*- and *vtx2*-positive and 40 strains (22,9 %) were *vtx*-negative.

Of all 175 (including strain NCTC 12900) *E. coli* O157 strains analysed using PFGE with *Xba*I restriction, a relationship of $53,4 \pm 6,4$ % (dice-coefficient with 1,2%

tolerance) was found. 85 *Xba*I-RFM were detected altogether. The analysis of the macrorestriction patterns with *Sfi*I in the PFGE was less appropriate for the differentiation of *E. coli* O157 strains than the other fingerprinting methods used.

Of the 145 (including strain NCTC 12900) *E. coli* O157 strains analysed using *p*-gene determination 18 different profiles were detected.

The results of the PFGE analysis demonstrated that identical clones (identical or similar *Xba*I-RFM) of *E. coli* O157 could be found in different countries (Denmark, Canada, Scotland, USA and different regions of Germany). Also five *Xba*I-RFM were isolated from different materials (human faces, food and animal faces).

The PFGE was able to achieve the subdivision of the studied *E. coli* O157 strains in distinct clones. The first group includes verotoxinogenic, sorbitol-negative and β -D-glucuronidase-negative *E. coli* O157 strains (n = 129; strains with *Xba*I-RFM of group A and verotoxinogenic strains from a herd of mothercows - *Xba*I-RFM B4, B5 and B6). The second group is composed of verotoxinogenic, sorbitol-positive or negative and β -D-glucuronidase-positive *E. coli* O157 strains (n = 6, *Xba*I-RFM B1 and B3). The last group is composed of non verotoxinogenic, β -D-glucuronidase-positive and sorbitol-positive or -negative *E. coli* O157 strains with a lower relationship grade (n = 39).

PFGE is considered as a good fingerprinting method and has been frequently used for this aim. However, in this work it is also demonstrated, that the *p*-gene-analysis is also appropriate for the differentiation of isolates, also those with high or identical dice-coefficient and with similar virulence profile.

It can therefore be concluded that PFGE together with serotyping, biochemical analysis, verotoxintyping and *p*-gene-Analysis are valuable laboratory tools for an expended epidemiological surveillance of *E. coli* O157-strains.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- ABAAS, S., A. FRANKLIN, I. KUHN, F. ORSKOV und I. ORSKOV (1989)
Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats
Am. J. Vet. Res. 50, 1294-1296
- ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2000)
Optimization of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of verocytotoxin type 2d
Proc. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 389-394
- ABDUL-RAOULF, U.M., L.R. BEUCHAT und M.S.AMMAR (1993a)
Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables
Appl. Environ. Microbiol. 59, 1999-2006
- ABDUL-RAOULF, U.M., L.R. BEUCHAT und M.S.AMMAR (1993b)
Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature
Appl. Environ. Microbiol. 59, 2364-2368
- ACHESON, D.W.K. und A. DONOHUE-ROLFE (1989)
Cancer associated hemolytic uremic syndrome. A possible role of mitomycin C in relation to Shiga-like toxins
J. Clin. Oncol. 7, 1943
- ADU-BOBIE, J., G. FRANKEL, C. BAIN, A.G. GONCALVES, L.R. TRABULSI, G. DOUCE, S. KNUTTON und G. DOUGAN (1998)
Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens
J. Clin. Microbiol. 36, 662-668
- AGIN, T.S. und M.K. WOLF (1997)
Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans and swine
Infect. Immun. 65, 320-326
- AHMED, R., C. BOPP, A. BORCZYK und S. KASATIYA (1987)
Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7
J. Infect. Dis. 155, 806-809
- AKIBA, M., D. H. RICE, M.A. DAVIS, T. MASUDA, T. SAMESHIMA, M. NAKAZAWA und D.D. HANCOCK (2000)
A comparison of *Escherichia coli* O157 isolates from cattle in Japan and the USA by molecular biological methods
Epidemiol. Infect. 125, 221-224
- ALBERT, M.J., S.M. FARUQUE, A.S.G. FARUQUE, K.A. BETTELHEIM, P.K.B. NEOGI, N.A. BHUIYAN und J.B. KAPER (1996)
Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children
J. Clin. Microbiol. 34, 717-719

- ALEKSIĆ, S., H. KARCH und J. BOCKEMÜHL (1992)
A biotyping scheme for Shiga-like (Vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other gram-negative bacteria
Zbl. Bakt. 276, 221-230
- ALEXANDER, T.J.L. (1994)
Neonatal diarrhoea in pigs
In: GYLES, C.L., *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB International, Wallingford, United Kingdom
- AL-JUMAILI, D.W.K., D.A. BURKE, S.M. SCOTLAND, H.M. AL-MARDINI und C.O. RECORD (1992)
A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*
FEMS Microbiol. Lett. 93, 121-126
- ALLERBERGER, F., M.P. DIERICH, U. GRUBER-MOESENBACHER, A. LIESEGANG, R. PRAGER, G. HARTMANN, W. RABSCH, H. TSCHÄPE und H. KARCH (2000)
Nontoxigenic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻ associated with a family outbreak of diarrhoea
Wien. Klein. Wochenschr. 112/19, 846-850
- ALLISON, L., A. STIRRAT und F.M. THOMSON-CARTER (1998)
Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* O157:H7 in Scotland and its utility in strain subtyping
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17, 844-848
- ALLISON, L.J., P.E. CARTER und F.M. THOMSON-CARTER (2000)
Characterization of a recurrent clonal type of *Escherichia coli* O157:H7 causing major outbreaks of infection in Scotland
J. Clin. Microbiol. 38, 1632-1635
- ALTEKRUSE, S.F., B.B. TIMBO, J.C. MOWBRAY, N.H. BEAN und M.E. POTTER (1998)
Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers
Food Prot. 61, 1405-1407
- ANONYMOUS (1995)
Übersicht: Die Pathovaren von *Escherichia coli* beim Menschen
Epid. Bull. 30, 205-206
- ANONYMOUS (1996a)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection
Wkly. Epidemiol. Rec. 35, 267-268
- ANONYMOUS (1996b)
Häufung von EHEC-Erkrankungen in Bayern
Epid. Bull. 20, 137-138
- ANONYMOUS (1997)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection
Wkly. Epidemiol. Rec. 25, 185
- ANONYMOUS (1998a)
Zur Situation bei ausgewählten meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1997, Teil I: Gastroenteritiden
Epid. Bull. 9, 55-62

- ANONYMOUS (1998b)
EHEC-Infektionen und HUS jetzt meldepflichtig
Epid. Bull. 50, 359
- ANONYMOUS (1999)
Fallbericht: Inkomplettes HUS bei EHEC-Enteritis, übertragen durch Minipferd
Epid. Bull. 37, 276
- ANONYMOUS (2000)
Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern § 4 (2) des Gesetzes zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG)
Bundesgesundheitsbl. 43, 845-869
- ANONYMOUS (2001a)
Outbreak of *E. coli* O157:H7 infection in Spain
Dairy Food Environ. San. 21, 242-243
- ANONYMOUS (2001b)
Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten
Epid. Bull. 25, 184
- ANONYMOUS (2002a)
Erkrankungen nach Geschlecht
In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001, Mercedes-Druck, Berlin, 34-35
- ANONYMOUS (2002b)
Erkrankung durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Stämme (EHEC)
In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001, Mercedes-Druck, Berlin, 50-53
- ANONYMOUS (2002c)
E. coli, sonstige darmpathogene Stämme
In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001, Mercedes-Druck, Berlin, 47-49
- APPEL, G., C. EWALD, A. HEER, G.V. MICKWITZ, S. ALEKSIC, H. RÜSSMANN, T. MEYER und H. KARCH (1989)
Vorkommen und Bedeutung von Verotoxin-(Shiga-like-Toxin-)produzierenden *Escherichia coli*-Stämmen beim Schwein
Tierärztl. Umschau 44, 410-420
- BALJER, G., L. WIELER, R. BAUERFEIND, S.-B. LUDWIG und A. MAYR (1990)
Nachweis von Vero- (Shiga-Like-)toxinbildenden *E.coli*-Keimen (VTEC) mittels Zellkulturtest und DNA-Hybridisierung bei durchfallkranken Kälbern
Tierärztl. Umschau 45, 71-78
- BARKOCY-GALLAGHER, G.A., T.M. ARTHUR, G.R. SIRAGUSA, J.E. KEEN, R.O. ELDER, W.W. LAEGREID, und M. KOOHMORAIE (2001)
Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the midwestern states of the United States
Appl. Environ. Microbiol. 67, 3810-3818

- BARRETT, T.J., J.H. KAPER, A.E. JERSE und I.K. WACHSMUTH (1992)
Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle
J. Infect. Dis. 165, 979-980
- BAST, D.J., J.L. BRUNTON, M.A. KARMALI und S.E. RICHARDSON (1997)
Toxicity and immunogenicity of a verotoxin 1 mutant with reduced globotriaosylceramide receptor binding in rabbits
Infect. Immun. 65, 2019-2028
- BENJAMIN, M.M. und A.R. DATTA (1995)
Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1669-1672
- BEUTIN, L., M.A. MONTENEGRO, I. ØRSKOV, F. ØRSKOV, J. PRADA, S. ZIMMERMANN und R. STEPHAN (1989)
Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 27, 2559-2564
- BEUTIN, L., D. GEIER, H. STEINRÜCK, S. ZIMMERMANN und F. SCHEUZ (1993)
Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals
J. Clin. Microbiol. 31, 2483-2488
- BEUTIN, L., S. ALEKSIC, J. BOCKEMÜHL, A. SCHWARZKOPF und H. KARCH (1994)
Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993
Bundesgesundhbl. 37, 410-414
- BEUTIN, L. D. GEIER, S. ZIMMERMANN und H. KARCH (1995)
Virulence markers of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species
J. Clin. Microbiol. 33, 631-635
- BEUTIN, L. (1996)
Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)
Bundesgesundhbl. 11, 426-429
- BEUTIN, L., G. KNOLLMANN-SCHANBACHER, W. RIETSCHEL und H. SEEGER (1996)
Animal reservoirs of *Escherichia coli* O157:[H7]
Vet. Rec. 139, 70-71
- BEUTIN, L., D. GEIER, S. ZIMMERMANN, S. ALEKSIC, H.A. GILLESPIE und T.S. WHITTAM (1997)
Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing shiga toxins in separate populations of cattle and sheep
Appl. Environ. Microbiol. 63, 2175-2180
- BEUTIN, L., M. BÜLTE, A. WEBER, S. ZIMMERMANN und K. GLEIER (2000)
Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission
Epidemiol. Infect. 125, 47-54

- BIELASZEWSKA, M., I. CLARKE, M.A. KARMALI und M. PETRIC (1997)
Localization of intravenously administered verocytotoxins (shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits with homologous and heterologous toxoids and toxin subunit
Infect. Immun. 65, 2509-2516
- BIELASZEWSKA, M., H. SCHMIDT, M.A. KARMALI, R. KHAKHRIA, J. JANDA, K. BLÁHOVÁ und H. KARCH (1998)
Isolation and characterization of sorbitol-fermenting shiga toxin (verocytotoxin-) producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains in the Czech Republic
J. Clin. Microbiol. 36, 2135-2137
- BILGE, S.S., J.J.C. VARY, S.F. DOWELL und P.I. TARR (1996)
Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus
Infect. Immun. 64, 4795-4801
- BITZAN, M. und H. KARCH (1992)
Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS): Enterohämorrhagische *Escherichia coli* O157 als häufigste Erreger
Dt. Ärztebl. 89, 1359-1364
- BLACKBURN, C.W., L.M. CURTIS, L. HUMPHESON, C. BILLON und P.J. MCCLURE (1997)
Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors
Int. J. Food Microbiol. 38, 31-44
- BLANCO, J.E., M. BLANCO, J. BLANCO, L. RIOJA und J. DUCHA (1994)
Serotypes, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and healthy rabbits in Spain
Vet. Microbiol. 38, 193-201
- BLANCO, M., J.E. BLANCO, J. BLANCO, E.A. GONZALEZ, A. MORA, C. PRADO, L. FERNANDEZ, M. RIO, J. RAMOS und M.P. ALONSO (1996)
Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle
Epidemiol. Infect. 117, 251-257
- BLANCO, J.E., M. BLANCO, A. MORA und J. BLANCO (1997)
Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity
J. Clin. Microbiol. 35, 2953-2957
- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH, H. RÜSSMANN, S. ALEKSIC, R. WIB und P. EMMRICH (1990)
Shiga-like Toxin (Verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8: Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom
Bundesgesundhbl. 33, 3-6
- BOCKEMÜHL, J. und H. KARCH (1996)
Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995)
Bundesgesundhbl. 39, 290-296
- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH und H. TSCHÄPE (1997)
Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996
Bundesgesundhbl. 40, 194-197

- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH und H. TSCHÄPE (1998)
Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997
Bundesgesundhbl. 41, 2-5
- BOERLIN, P., S. CHEN, J.K. COLBOURNE, R. JOHNSON, S. GRANDIS und C. GYLES (1998)
Evolution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin Plasmids and the Locus for Enterocyte Effacement in Shiga Toxin-Producing *E. coli*
Infect. Immun. 66, 2553-2561
- BÖHM, H. und H. KARCH (1992)
DNA Fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis
J. Clin. Microbiol. 30, 2169-2172
- BONNET, R., B. SOUWEINE, G. GAUTHIER, V. LIVRELLI, J. SIROT, B. JOLY und C. FORESTIER (1998)
Non-O157:H7 Stx 2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults
J. Clin. Microbiol. 36, 1777-1780
- BOUVET, J., C. BAVAI, R. ROSSEL, A. LE ROUX, M.P. MONTET, S. RAY-GUENIOT, C. MAZUY, V. ATRACHE und C. VERNOSY-ROZAND (2002)
Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7
Int. J. Food Microbiol. 77, 91-97
- BRADFORD, A.K., P.M. GRIFFIN, N.A. STROCKBINE und J.G. WELLS (1994)
Too fast food: bloody diarrhea and death from *Escherichia coli* O157:H7
Clin. Microbiol. Newsletter 16, 17-19
- BRADLEY, A.J. und M.J. GREEN (2001)
Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland
J. Clin. Microbiol. 39, 1845-1849
- BRASHEARS, M.M., S.S. REILLY und S.E. GILLILAND (1998)
Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat
J. Food Prot. 61, 166-170
- BROWN, C.A., B.G. HARMON, T. ZHAO und M.P. DOYLE (1997)
Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves
Appl. Environ. Microbiol. 63, 27-32
- BRÜCKLER, J., H., BLOBEL und K. PREISSNER (1991)
Serologische Methoden
In: BLOBEL, H. und T. SCHLIEBER, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band 1, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart
- BRUDZINSKI, L. und M.A. HARRISON (1998)
Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid
J. Food Prot. 61, 542-546
- BRUNDER, W., H. SCHMIDT und H. KARCH (1996)
KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
Microbiology 142, 3305-3315

- BRUNDER, W., H. SCHMIDT und H. KARCH (1997)
EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, cleaves human coagulation factor V
Mol. Microbiol. 24, 767-778
- BRUNDER, W., A.S. KHAN, J. HACKER und H. KARCH (2001)
Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-)
Infect. Immun. 69, 4447-4457
- BÜLTE, M. und V. WROCKLAGE (1992)
Die PCR-Technik zur Ermittlung von verotoxinogenen *E. coli*-Stämmen bei Schlacht- und Nutztieren
Proc. 33. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 486-495
- BÜLTE, M. (2001)
Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 473-477
- BÜLTE, M. (2002)
Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC)
Bundesgesundhbl. 6, 484-490
- BÜLTE, M., M. GOLL und A. STAHL (2002)
Nachweis von non-O157 VTEC- und O157-Stämmen in einer Mutterkuhherde in Weidehaltung
Proc. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 190-195
- BÜLTE, M. (2003)
Mikrobiologische Kontaminanten und Risiken bei Fleisch und Fleischprodukten
Symposium der Akademie für Tiergesundheit zur „Sicherheit von Lebensmitteln tierischen Ursprung“, Wiesbaden, Deutschland, 6.-7. März 2003
- BÜRK, C., R. DIETRICH, G. AÇAR, M. BÜLTE und E. MÄRTLBAUER et al. (2002)
Nachweis und Charakterisierung einer neuen Variante von Shiga Toxin 1 aus einem Rinderkot-Isolat *E. coli* O n.t.:H19
Proc. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 422-426
- BURKHARDT, F. (1992)
Mikrobiologische Diagnostik
George Thieme Verlag, Stuttgart
- CAPRIOLI, A., V. FALBO, L.G. RODA, F.M. RUGGERI und C. ZONA (1983)
Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxin factor that induces Morphological cell alterations
Infect. Immun. 39, 1300-1306
- CAPRIOLI, A., V. FALBO, F.M. RUGGERI, L. BALDASSARRI, R. BISICCHIA, G. IPPOLITO, E. ROMOLI und G. DONELLI (1987)
Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections
J. Clin. Microbiol. 25, 146-149

- CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (1999)
Surveillance for outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infections: Summary of 1998 data
<http://www.cdc.gov/>
- CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2000)
Summary of outbreaks of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli* reported to the CDC in 1999
<http://www.cdc.gov/>
- CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2001)
Outbreaks caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Summary of 2000 Surveillance data
<http://www.cdc.gov/>
- CEBULA, T.A., W.L. PAYNE und P.FENG (1995)
Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR
J. Clin. Microbiol. 33, 248-250
- CERQUEIRA, A.M.F., A. TIBANA und B.E.C. GUTH (1997)
High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil
J. Food Prot. 60, 177-180
- CHALMERS, R.M., R.L. SALMON, G.A. WILLSHAW, T. CHEASTY, N. LOOKER, I. DAVIS und C. WRAY (1997)
Vero-cytotoxigenic-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses
Lancet 349, 1816
- CHAPMAN, P.A., C.A. SIDMONS, A.T. CERDAN MALO und M.A. HARKIN (1997)
A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry
Epidemiol. Infect. 119, 245-250
- CHAPMAN, P.A., M.ELLIN, R. ASHTON und W. SHAFIQUE (2001)
Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products
Int. J. Food Microbiol. 68, 11-20
- CHINEN, I., J.D. TANARO, E. MILIWEBSKY, L.H. LOUND, G. CHILLEMI, S. LEDRI, A. BASCHKIER, M. SCARPIN, E. MANFREDI, und M. RIVAS (2001)
Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina
J. Food Prot. 64, 1346-1351
- CIMOLAI, N., S. BASALYGA, D.G. MAH, B.J. MORRISON und J.E. CARTER (1994)
A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome
Clin. Nephrol. 42, 85-89
- COBBOLD, R. und P. DESMARCHELIER (2001)
Characterization and clonal relationships of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle
Vet. Microbiol. 79, 323-335

- COIA, J.E., Y. JOHNSTON, N.J. STEERS und M.F. HANSON (2001)
A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheese in south-east Scotland
Int. J. Food Microbiol. 66, 63-69
- CRAY, W.C. und H.W. MOON (1995)
Experimental infection of calves with *Escherichia coli* O157:H7
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1586-1590
- CRAY, W.C., T.A. CASEY, B.T. BOSWORTH und M.A. RASMUSSEN (1998)
Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1975-1979
- DARGATZ, D.A., S.J. WELLS, L.A. THOMAS, D.D. HANCOCK und L.P. GARBER (1997)
Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in feces of feedlot cattle
J. Food Prot. 60, 466-470
- DATZ, M., C. JANETZKI-MITTMANN, S. FRANKE, F. GUNZER, H. SCHMIDT und H. KARCH (1996)
Analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and shiga-like toxin structural genes
Appl. Environ. Microbiol. 62, 791-797
- DEAN-NYSTROM, E.A., B.T. BOSWORTH, W.C. CRAY und H.W. MOON (1997)
Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves
Infect. Immun. 65, 1842-1848
- DEAN-NYSTROM, E.A., B.T. BOSWORTH, H.W. MOON und A.D. O'BRIEN (1998)
Escherichia coli O157:H7 requires Intimin for enteropathogenicity in calves
Infect. Immun. 66, 4560-4563
- DEGRANDIS, S., H. LAW, J. BRUNTON, C. GYLES und C.A. LINGWOOD (1989)
Globotetraosyl ceramide is recognized by pig edema disease toxin
J. Biol. Chem. 264, 12520-12525
- DENG, Y., J.-H. RYU und L.R. BEUCHAT (1998)
Influence of temperature and pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry foods and growth in reconstituted infant rice cereal
Int. J. Food Microbiol. 45, 173-184
- DESCHENES, G., C. CASENAVE, F. GRIMONT, J.C. DESENCLOS, S. BENOIT, M. COLLIN, S. BARON, P. MARIANI, P.A. GRIMONT und H. NIVET (1996)
Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese
Pediatr. Nephrol. 10, 203-205
- DESLISLE, G.J. und A. LEY (1989)
Rapid detection of *Escherichia coli* in urine samples by a new chromogenic β -glucuronidase assay
J. Clin. Microbiol. 27, 778-779
- DESMARCHELIER, P.M. (1997)
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* – The Australian perspective
J. Food Prot. 60, 1447-1450

- DESROSIERS, A., J.M. FAIRBROTHER, R.P. JOHNSON, C. DESAUTELS, A. LETELLIER und S. QUESSY (2001)
Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* verotoxin-producing isolates from humans and pigs
J. Food Prot. 64, 1904-1911
- DIEZ-GONZALEZ, F., T.R. CALLAWAY, M.G. KIZOULIS und J.B. RUSSELL (1998)
Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle
Science 281, 1666-1668
- DJORDJEVIC, S.P., M.A. HORNITZKY, G. BAILEY, P. GILL, B. VANSELOW, K. WALKER, und K.A. BETTELHEIM (2001)
Virulence properties and serotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep
J. Clin. Microbiol. 39, 2017-2021
- DJURETIC T., P.G. WALL, G. NICHOLS (1997)
General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996
Commun. Dis. Rep. CDR Rev. 7, 41-45
- DOYLE, M.P. und J.L. SCHOENI (1984)
Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis
Appl. Environ. Microbiol. 48, 855-856
- FAGUNDES-NETO, U. und I.C.A. SCALETSKY (2000)
The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition
São Paulo Med. J. 118, 21-29
- FAITH, N.G., N. PARNIERE, T. LARSON, T.D. LORANG und J.B. LUCHANSKY (1997)
Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and -20 °C under air, vacuum and CO₂
Int. J. Food Microbiol. 37, 47-54
- FANG, G.D., A.A.M. LIMA, C.V.MARTINS, J.P. NATARO und R.L. GUERRANT (1995)
Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 21, 137-144
- FANTELLI, K. und R. STEPHAN (2001)
Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland
Int. J. Food Microbiol. 70, 63-69
- FARMER III, J.J. und B.R. DAVIS (1985)
H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis
J. Clin. Microbiol. 22, 620-625
- FARRELL, B.L., A.B. RONNER und A.C.L.WONG (1998)
Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid
J. Food Prot. 61, 817-822

- FEATHERSTONE, C. (1997)
Escherichia coli O157: superbug or mere sensation?
Lancet 349, 930
- FEGAN, N. und P. DESMARCHELIER (2002)
Comparison between human and animal isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from Australia
Epidemiol. Infect. 128, 357-362
- FENG, P. (1995)
Escherichia coli serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants
Emerg. Infect. Dis. 1, 47-52
- FENG, P., P.I. FIELDS, B. SWAMINATHAN und T.S. WHITTAM (1996)
Characterization of nonmotile variants of *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an anti-flagellin monoclonal antibody
J. Clin. Microbiol. 34, 2856-2859
- FENG, P., K. A. LAMPEL, H. KARCH und T.S. WHITTAM (1998)
Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7
J. Infect. Dis. 177, 1750-1753
- FENG, P., M. DEY, A. ABE und T. TAKEDA (2001)
Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga Toxin 1 and 2 genes
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 711-717
- FERENC, J., J. OLIVER, R. WITKOVSKY, L. MCLANDSBOROUGH und R.E. LEVIN (2000)
Studies on the growth of *Escherichia coli* O157:H7 strains at 45.5 °C
J. Food Prot. 63, 1173-1178
- FIELDS, P.I., K. BLOM, H.J. HUGHES, L.O. HELSEL, P. FENG und B. SWAMINATHAN (1997)
Molecular characterization of gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM
J. Clin. Microbiol. 35, 1066-1070
- FISCHER, J.R., T. ZHAO, M.P. DOYLE, M.R. GOLDBERG, C.A. BROWN, C.T. SEWELL, D.M. KAVANAUGH und C.D. BAUMAN (2001)
Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer
Appl. Environ. Microbiol. 67, 1218-1224
- FORESTIER, C., M. MEYER, S. FAVRE-BONTE, C. RICH, G. MALPUECH, C. BOUGUENEC, J. SIROT, B. JOLY und C. CHAMPS (1996)
Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study
J. Clin. Microbiol. 34, 2897-2903
- FOSCHINO, R., A. INVERNIZZI, R. BARUCCO und K. STRADIOTTO (2002)
Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the bergamo region of Italy during a lactation year
Dairy Res. 69, 213-25

- FRANCIS, D.H., R.A. MOXLEY und C.Y. ANDRAOS (1989)
Edema disease-like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7
Infect. Immun. 57, 1339-1342
- GALLAND, J.C., D.R. HYATT, S.S. CRUPPER und D.W. ACHESON (2001)
Prevalence, Antibiotic Susceptibility, and Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from a Longitudinal Study of Beef Cattle Feedlots
Appl. Environ. Microbiol. 67, 1619-1627
- GALLIEN, P., H. KARCH, C. MUCH, H. STEINRÜCK, S. LEHMANN, M. TIMM, H. RICHTER, K.-W. PERLBERG und D. PROTZ (2000)
Subtypisierung von *eae*-Genen in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC)
Fleischwirtsch. 2, 84-89
- GANNON, V.P.J., M. RASHED, R.K. KING und E.J.G. THOMAS (1993)
Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 31, 1268-1274
- GANNON, V.P.J., T.A. GRAHAM, R. KING, P. MICHEL, S. READ, K. ZIEBELL und R.P. JOHNSON (2002)
Escherichia coli O157:H7 infection in cows and calves and calves in a beef cattle herd in Alberta, Canada
Epidemiol. Infect. 129, 163-172
- GARREN, D.M., M.A. HARRISON und S.M. RUSSELL (1997)
Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates
J. Food Prot. 60, 1478-1482
- GARREN, D.M., M.A. HARRISON und S.M. RUSSELL (1998)
Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride
J. Food Prot. 61, 158-161
- GEORNARAS, I., J.W. HASTINGS und A. VON HOLY (2001)
Genotypic Analysis of *Escherichia coli* Strains from Poultry Carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents
Appl. Environ. Microbiol. 67, 1940-1944
- GERBER, A., H. KARCH, F. ALLERBERGER, H.M. VERWEYEN und L.B. ZIMMERHACKL (2002)
Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study
J. Infect. Dis. 186, 493-500
- GERMANI, Y., B. SORO, M. VOHITO, O. MOREL und J. MORVAN (1997)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Central African Republic
Lancet 349, 1670
- GEUE, L., M. SEGURA-ALVAREZ, F.J. CONRATHS, T. KUCZIUS, J. BOCKEMÜHL, H. KARCH und P. GALLIEN (2002)
A long-term study on the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms
Epidemiol. Infect. 129, 173-185

- GIAMMANCO, A., M. MAGGIO, G. GIAMMANCO, R. MORELLI, F. MINELLI, F. SCHEUTZ und A. CAPRIOLI (1996)
Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea
J. Clin. Microbiol. 34, 689-694
- GIANANTONIO, C.A., M.A. VITACCO und F. MENDILAHARZU (1966)
The hemolytic uremic syndrome
Proc. 3rd. Int. Cong. Nephrol. 3, 24-36
- GLASS, K.A., J.M. LOEFFELHOLZ, J.P. FORD und M.P. DOYLE (1992)
Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH of sodium chloride and in fermented, dry sausage
Appl. Environ. Microbiol. 58, 2513-2516
- GOERING, R.V. (1998)
The molecular epidemiology of nosocomial infections. An overview of principles, applications and interpretation
In: SPENCER et al., Rapid detection of infectious agents, Plenum Press, New York, 131-157
- GOMES, T.A.T., M.R.F. TOLEDO, L.R. TRABULSI, P.K. WOOD und J.G. MORRIS (1987)
DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 25, 2025-2027
- GREATOREX, J.S. und G.M. THORNE (1994)
Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in haemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects
J. Clin. Microbiol. 32, 1172-1178
- GRIF, K., H. KARCH, C. SCHNEIDER, F.D. DASCHNER, L. BEUTIN, T. CHEASTY, H. SMITH, B. ROWE, M.P. DIERICH und F. ALLERBERGER (1998)
Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 32, 165-76
- GRIFFIN, P.M. und R.V. TAUXE (1991)
The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome
Epidemiol. Rev. 13, 60-98
- GUNZER, F., H. BÖHM, H. RÜSSMANN, M. BITZAN, S. ALEKSIC und H. KARCH (1992)
Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. 30, 1807-1810
- GUTH, B.E.C. (2000)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* – an overview
Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 95-97
- GUTH, B.E.C., I. CHINEN, E. MILIWEBSKY, A.M.F. CERQUEIRA, G. CHILLEMI, J.R.C. ANDRADE, A. BASCHKIER und M. RIVAS (2003)
Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil
Vet. Microbiol. 92, 335-349

- HANCOCK, D.D., D.H. RICE, D.E. HERRIOTT, T.E. BESSER, E.D. EBEL und L.V. CARPENTER (1997)
Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle
J. Food Prot. 60, 363-366
- HAO, Y.Y. und R.E. BRACKETT (1993)
Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in modified atmosphere
J. Food Prot. 56, 330-332
- HARSONO, K.D., C.W. KASPAR und J.B. LUCHANSKY (1993)
Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis
Appl. Environ. Microbiol. 59, 3141-3144
- HATHCOX, A.K., L.R. BEUCHAT und M.P. DOYLE (1995)
Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature
Appl. Environ. Microbiol. 61, 4172-4177
- HEIR, E., B.-A. LINDSTEDT, T. VARDUND, Y. WASTESON und G. KAPPERRUD (2000)
Genomic fingerprinting of shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and fluorescent amplified-fragment length polymorphism (FAFLP)
Epidemiol. Infect. 125, 537-548
- HEUVELINK, A.E., F.L.A.M. VAN DEN BIGGELAAR, E. DE BOER, R.G. HERBES, W.J.G. MELCHERS, J.H.J. HUIS IN 'T VELD und L.A.H. MONNENS (1998a)
Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep
J. Clin. Microbiol. 36, 878-882
- HEUVELINK, A.E., F.L.A.M. VAN DEN BIGGELAAR, J.T.M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R.G. HERBES, R. HUYBEN, N. NAGELKERKE, W.J.G. MELCHERS, L.A.H. MONNENS und E. DE BOER (1998b)
Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms
J. Clin. Microbiol. 36, 3480-3487
- HEUVELINK, A.E., J.T. ZWARTKRUIS-NAHUIS, F.L. VAN DEN BIGGELAAR, W.J. VAN LEEUWEN und E. DE BOER (1999a)
Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry
Int. J. Food Microbiol. 52, 67-75
- HEUVELINK, A.E., J.T. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R.R. BEUMER und E. DE BOER (1999b)
Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in the Netherlands
J. Food Prot. 62, 1115-1122
- HEUVELINK, A.E., C. VAN HEERWAARDEN, J.T.M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R. VAN OOSTEROM, K. EDINK, Y.T.H.P. VAN DUYPHOVEN und E. DE BOER (2002)
Escherichia coli infection associated with petting zoo
Epidemiol Infect. 129, 295-302

- HOCKIN, J., S. MARCH und S. RATMAN (1983)
Hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7 – Newfoundland and Labrador
Can. Dis. Weekly Report 9, 182-184
- HOFINGER, C., H. KARCH und H. SCHMIDT (1998)
Structure and function of plasmid pColD157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. 36, 24-29
- HOLLAND, R.E., A. SCHMIDT, N. SRIRANGANATHAN, S.D. GRIMES, R.A. WILSON, C.M. BROWN und R.D. WALKER (1996)
Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals
Vet. Microbiol. 48, 243-255
- HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STALEY und S.T. WILLIAMS (1994)
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
Williams & Wilkins Verlag, neunte Auflage, 179-180
- HUANG, S.W., C.H. CHANG, T.F. TAI und T.C. CHANG (1997)
Comparison of the β -glucuronidase assay and the conventional method for identification of *Escherichia coli* on eosin-methylene blue agar
J. Food Prot. 60, 6-9
- HUBER, H.C., R. KUGLER und B. LIEBL (1998)
Infektionen mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) – Ergebnisse einer epidemiologischen Erhebung in Bayern für den Zeitraum April 1996 bis März 1997
Gesundheitsw. 60, 159-165
- HUDSON, L.M., J. CHEN, A.R. HILL und M.W. GRIFFITHS (1997)
Bioluminescence: a rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and cheese varieties
J. Food Prot. 60, 891-897
- HUPPERTZ, H.-I., S. RUTKOWSKI, S. ALEKSIC und H. KARCH (1997)
Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe
Lancet 349, 1660-1662
- ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS) (1996)
In: Microorganisms in foods 5: characteristics of microbial pathogens, Blackie Academic & Professional, London, England, 126-140
- IGUCHI, A., R. OSAWA, J. KAWANO, A. SHIMIZU, J. TERAJIMA und H. WATANABE (2002)
Effects of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis profiles
J. Clin. Microbiol. 40, 3079-3081
- ISOGAI, E., H. ISOGAI, K. TAKESHI und T. NISHIKAWA (1998)
Protective effect of Japanese green tea extract on gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain
Microbiol. Immunol. 42, 125-128

- ITO, H., A. TERA, H. KURAZANO, Y. TAKEDA und M. NISHIBUSHI (1990)
Cloning and nucleotide sequencing of verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from patients with hemolytic uremic syndrome
Microbiol. Pathol. 88, 47-60
- ITOH, Y., I. NAGANO, M. KUNISHIMA und T. EZAKI (1997)
Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O Untypeable:H10 associated with massive outbreak of gastrointestinal illness
J. Clin. Microbiol. 35, 2546-2550
- IZUMIYA, H., J. TERAJIMA, A. WADA, Y. INAGAKI, K. ITOH, K. TAMURA und H. WATANABE (1997)
Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis
J. Clin. Microbiol. 35, 1675,1680
- JACKSON, M.P., R.J. NEILL, A.D. O'BRIEN, R.K. HOLMES und J.W. NEWLAND (1987)
Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933
FEMS Microbiol. Lett. 44, 109-114
- JACOB, M. (1998)
The scottish *E. coli* O157 fatal accident inquiry
Int. Food Saf. News 7, 10
- JOHNSEN G., Y. WASTESON, E. HEIR, O.I. BERGET und H. HERIKSTAD (2001)
Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in southwest part of Norway during 1998 and 1999
Int. J. Food Microbiol. 65, 193-200
- JOHNSON, J.M., S.D. WEAGANT, K.C. JINNEMAN und J.L. BRYANT (1995)
Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-borne outbreak
Appl. Environ. Microbiol. 61, 2806-2808
- KARCH, H., P. GORONCY-BERMES, W. OPFERKUCH, H.P. KROLL, A.D. O'BRIEN (1985)
Subinhibitory concentrations of antibiotics modulate amount of Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli*
In: ADAM, D., H. HAHN und W. OPFERKUCH, The influence of antibiotics on the host-parasite-relationships, II, Springer, Berlin, 239
- KARCH, H., J. HEESEMANN, R. LAUFS, A.D. O'BRIEN, C.O. TACKET und M.M. LEVINE (1987)
A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells
Infect. Immun. 55, 455-461
- KARCH, H. und J. BOCKEMÜHL (1989)
Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC): ein klinisches und mikrobiologisches Problem und eine Herausforderung für den öffentlichen Gesundheitsdienst
Immun. Infekt. 17, 206-211
- KARCH, H. und T. MEYER (1989a)
Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 27, 1180-1186

- KARCH, H. und T. MEYER (1989b)
Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 27, 2751-2757
- KARCH, H., T. MEYER, H. RÜSSMANN und J. HEESEMANN (1992)
Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation
Infect. Immun. 60, 3464-3467
- KARCH, H., H. BÖHM, H. SCHMIDT, F. GUNZER, S. ALEKSIC und J. HEESEMANN (1993)
Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻
J. Clin. Microbiol. 31, 1200-1205
- KARCH, H., H. RÜSSMANN, H. SCHMIDT, A. SCHWARTZKOPF und J. HEESEMANN (1995)
Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases
J. Clin. Microbiol. 33, 1602-1605
- KARCH, H., H. SCHMIDT und A. SCHWARZKOPF (1996)
Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
Die gelben Hefte 36, 125-135
- KARCH, H. (1997)
Enterohämorrhagische *Escherichia coli*: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie
Symposium Medical 3, 20
- KARCH, H., H. HUPPERTZ, J. BOCKEMÜHL, H. SCHMIDT, A. SCHWARZKOPF und R. LISSNER (1997)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany
J. Food Prot. 60, 1454-1457
- KARCH, H. und M. BIELASZEWSKA (2001)
Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis
J. Clin. Microbiol. 39, 2043-2049
- KARIURI, S., C. GILKS, J. KIMARI, J. MUYODI, P. WAIYAKI und C.A. HART (1999)
Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact
Appl. Environ. Microbiol. 65, 472-476
- KARMALI, M.A., B.T. STEELE, M. PETRIC und C. LIM (1983)
Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools
Lancet 19, 619-620
- KARMALI, M.A., M. PETRIC, C. LIM, R. CHEUNG und G.S. ARBUS (1985)
Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin
J. Clin. Microbiol. 22, 614-619

- KARMALI, M.A. (1989)
Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*
Clin. Microbiol. Rev. 2, 15-38
- KEENE WE, E. SAZIE , J. KOK , D.H. RICE, D.D. HANCOCK, V.K. BALAN, T. ZHAO und M.P. DOYLE (1997)
An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat
JAMA 277, 1229-1231
- KESKIMÄKI, M., M. SAARI, T. HEISKANEN und A. SIITONEN (1998)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates
J. Clin. Microbiol. 36, 3641-3646
- KIM, H.H., M. SAMADPOUR, L. GRIMM, C.R. CLAUSEN, T.E. BESSER, M. BAYLOR, J.M. KOBAYASHI, M.A. NEILL, F.D. SCHOENKNECHT und P.I. TARR (1994)
Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991
J. Infect. Dis. 170, 1606-1609
- KLEIN, G. und M. BÜLTE (2003)
Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces
Food Microbiol. 20, 27-33
- KONOWALCHUK, J., J.I. SPEIRS und S. STAVRIC (1977)
Vero responses to a cytotoxin of *Escherichia coli*
Infect. Immun. 18, 775-779
- KRAUSE, U., F.M. THOMSON-CARTER und T.H. PENNINGTON (1996)
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing
J. Clin. Microbiol. 34, 959-961
- KRESSE, A.U., K. SCHULZE, C. DEIBEL, F. EBEL, M. RHODE, T. CHAKRABORTY und C.A. GUZMÁN (1998)
Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 180, 4370-4379
- KUDVA, I.T., C.W. HUNT, C.J. WILLIAMS, U.M. NANCE und C.J. HOVDE (1997)
Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep
Appl. Environ. Microbiol. 63, 3878-3886
- KUDVA, I.T., K. BLANCH und C.J. HOVDE (1998)
Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry
Appl. Environ. Microbiol. 64, 3166-3174
- KUDVA, I.T., P.S. EVANS, N.T. PERNA, T.J. BARRETT, G.J. DECASTRO, F.M. AUSUBEL, F.R. BLATTNER und S.B. CALDERWOOD (2002)
Polymorphic amplified typing sequences provide a novel approach to *Escherichia coli* O157:H7 strain typing
J. Clin. Microbiol. 40, 1152-1159

- KURIOKA, T., Y. YUNOU, H. HARADA und E. KITA (1998)
Enhancement of susceptibility to shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice
Infect. Immun. 66, 1726-1734
- LAHTI, E., M. KESKIMÄKI, L. RANTALA, P. HYVÖNEN, A. SIITONEN und T. HONKANEN-BUZALSKI (2001)
Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle
Vet. Microbiol. 79, 239-251
- LEVINE, M.M. und R. EDELMAN (1984)
Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis
Epidemiol. Rev. 6, 31-51
- LEVINE, M.M., J. XU, J.B. KAPER, H. LIOR, V. PRADO, B. TALL, J. NATARO, H. KARCH und K. WACHSMUTH (1987)
A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome
J. Infect. Dis. 156, 175-182
- LEYER, G.J., L. WANG und E.A. JOHNSON (1995)
Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods
Appl. Environ. Microbiol. 61, 3752-3755
- LIESEGANG, A., U. SACHSE, R. PRAGER, H. CLAUS, H. STEINRÜCK, S. ALEKSIC, W. RABSCH, W. VOIGT, A. FRUTH, H. KARCH, J. BOCKEMÜHL und H. TSCHÄPE (2000)
Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ in Germany - A ten-year study
Int. J. Med. Microbiol. 290, 269-278
- LISSNER, R., H. SCHMIDT und H. KARCH (1996)
A standard immunoglobulin preparation produced from bovine colostrum shows antibody reactivity and neutralization activity against Shiga-like toxins and EHEC-hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7
Infection 24, 378-83
- LÓPEZ, E.L., M.M. CONTRINI, M. SANZ, M.R. VIÑAS, A. PARMA, M.F. DE ROSA und T.G. CLEARY (1997)
Perspectives on Shiga-like toxin infections in Argentina
J. Food Prot. 60, 1458-1462
- LOUIE, M., J. DE AZAVEDO, R. CLARK, A. BORCZYK, H. LOIR, M. RICHTER und J. BRUNTON (1994)
Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers
Epidemiol. Infect. 112, 449-461
- MADICO, G., N.S. AKOPYANTS und D.E. BERG (1995)
Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures
J. Clin. Microbiol. 33, 1534-1536
- MAINIL, J.G., E.R. JACQUEMIN., A.E. KAECKENBEECK., P.H. POHL (1993)
Association between the *eae* gene and Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle
Am. J. Vet. Res. 54, 1064-1068

- MAKINO, S., H. KOBORI, H. ASAKURA, M. WATARAI, T. SHIRAHATA, T. IKEDA, K. TAKESHI und T. TSUKAMOTO (2000)
Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls
Epidemiol. Infect. 125, 55-61
- MARIANI-KURKDJIAN, P., E. DENAMUR, A. MILON, B. PICARD, H. CAVE, N. LAMBERT-ZECHOVSKY, C. LOIRAT, P. GOULLET, P.J. SANSONETTI und J. ELION (1993)
Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of haemolytic-uremic syndrome in France
J. Clin. Microbiol. 31, 296-301
- MARQUES, L.R.M., J.S.M. PEIRIS, S.J. CRYST und A.D. O'BRIEN (1987)
Escherichia coli strains isolated from pigs produce a variant of Shiga-like toxin II
FEMS Microbiol. Lett. 44, 33-38
- MARTIN, I.E., S.D. TYLER, K.D. TYLER, R. KHAKHRIA und W.M. JOHNSON (1996)
Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* O157 isolates
J. Clin. Microbiol. 34, 720-723
- MEAD, P.S. und P.M. GRIFFIN (1998)
Escherichia coli O157:H7
Lancet. 352, 1207-1212
- MECHIE, S.C., P.A. CHAPMAN und C.A. SIDDONS (1997)
A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd
Epidemiol. Infect. 118, 17-25
- MENG, J., S. ZHAO, T. ZHAO und M.P. DOYLE (1995)
Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and Plasmid DNA analysis
J. Med. Microbiol. 42, 258-263
- MIRANDA, A.G., K.V. SINGH und B.E. MURRAY (1991)
DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool
J. Clin. Microbiol. 29, 2752-2757
- MITSUDA, T., T. MUTO, M. YAMADA, N. KOBAYASHI, M. TOBA, Y. AIHARA, A. ITO und S. YOKOTA (1998)
Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by pulsed-field electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analysis
J. Clin. Microbiol. 36, 652-656
- MONTENEGRO, M.A., M. BÜLTE, T. TRUMPF, S. ALEKSIĆ, G. REUTER, E. BULLING und R. HELMUTH (1990)
Detection and characterization of fecal Verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle
J. Clin. Microbiol. 28, 1417-1421
- MORABITO, S., H. KARCH, P. MARIANI-KURKDJIAN, H. SCHMIDT, F. MINELLI, E. BINGEN und A. CAPRIOLI (1998)
Enterotoxigenic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of haemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. 36, 840-842

- MORABITO, S., G. DELL'OMO, U. AGRIMI, H. SCHMIDT, H. KARCH, T. CHEASTY, A. CAPRIOLI (2001)
Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons
Vet. Microbiol. 82, 275-283
- MOSSEL, D.A.A. und C.B. STRUIJK (1993)
Workshop on risk assessment of human exposure to pathogenic microorganisms
Int. J. Food Microbiol. 18, 239-244
- MÜHLDORFER, J., J. HACKER, G.T. KEUSCH, D.W. ACHESON, H. TSCHÄPE, A.V. KANE, A. RITTER, T. ÖLSCHLÄGER und A. DONOHUE-ROLFE (1996)
Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*
Infect. Immun. 64, 495-502
- MÜLLER, A., M. BÜLTE, und H. MACK (1998)
Überlebenskinetik und Virulenzfaktoren von verotoxinogenen bzw. enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-(VTEC-/EHEC-)Stämmen in Rohwurst
Proc. 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 495-499
- MUNIESA, M., J. RECKTENWALD, M. BIELASZEWSKA, H. KARCH und H. SCHMIDT (2000)
Characterization of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin
Infect. Immun. 68, 4850-4855
- MURASE, T., S. YAMAI und H. WATANABE (1999)
Changes in pulsed-field gel electrophoresis patterns in clinical isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 associated with loss of Shiga Toxin genes
Curr. Microbiol. 38, 48-50
- MURINDA, S.E., L.T. NGUYEN, S.J. IVEY, B.E. GILLESPIE, R.A. ALMEIDA, F.A. DRAUGHON und S.P. OLIVER (2002)
Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee
J. Food Prot. 65, 752-759
- NATARO, J.P., I.C.A. SCALETSKY, J.B. KAPER, M.M. LEVINE und L. R. TRABULSI (1985a)
Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*
Infect. Immun. 48, 378-383
- NATARO, J.P., M.M. BALDINI, J.B. KAPER, R.E. BLACK, N. BRAVO und M.M. LEVINE (1985b)
Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe
J. Infect. Dis. 152, 560-565
- NATARO, J.P., J.B. KAPER, R.R. BROWNE, V. PRADO, P. VIAL und M.M. LEVINE (1987)
Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells
Pediatr. Infect. Dis. J. 6, 829-831

- NATARO, J.P., J. SERIWATANA, A. FASANO, D.R. MANEVAL, L.D. GUERS, F. NORIEGA, F. DUBOVSKY, M.M. LEVINE und J.G. MORRIS (1995)
Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains
Infect. Immun. 63, 4721-4728
- NATARO, J.P. und J.B. KAPER (1998)
Diarrheagenic *Escherichia coli*
Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201
- NEILL, M.A. (1991)
Escherichia coli O157:H7: A pathogen of no small renown
Inf. Dis. Newsletter 10, 19-24
- NEMETH, J., C.A. MUCKLE und C.L. GYLES (1994)
In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates
Vet. Microbiol. 40, 231-238
- NG, W.F., B.E. LANGLOIS und W.G. MOODY (1997)
Fate of selected pathogens in vacuum-packaged dry-cured (country-style) ham slices stored at 2 and 25 °C
J. Food Prot. 60, 1541-1547
- NOTERMANS, S. und M. BORGDORFF (1997)
A global perspective of foodborne disease
J. Food Prot. 60, 1395-1399
- O'BRIEN, A.D., G.D. LAVECK, M.R. THOMPSON und S.B. FORMAL (1982)
Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*
J. Infect. Dis. 146, 763-769
- O'BRIEN, A.D., T.A. LIVELY, M.E. CHEN, S.W. ROTHMAN und S.B. FORMAL (1983)
Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin
Lancet 26, 702
- O'BRIEN, A.D. und R.K. HOLMES (1987)
Shiga and Shiga-like toxins
Microbiol. Rev. 51, 206-220
- O'LOUGHIN, E. (1997)
Escherichia coli O157:H7
Lancet 349, 1553
- ØRSKOV, F. und I. ØRSKOV (1984)
Serotyping of *Escherichia coli*
In: BERGAN, T., Methods in Microbiol., Academic Press, London, England, 15, 43-112
- OSWALD, E., H. SCHMIDT, S. MORABITO, H. KARCH, O. MARCHES und A. CAPRIOLI (2000)
Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant
Infect. Immun. 68, 64-71

- PADHYE, N.V. und M.P. DOYLE (1992)
Escherichia coli O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food
J. Food Prot. 55, 555-565
- PALUMBO, S., J. CALL, F. SCHULTZ und A. WILLIAMS (1995)
Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*
J. Food Prot. 58, 352-356
- PAROS, M., P.I. TARR, H. KIM, T.E. BESSER und D.D. HANCOCK (1993)
A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin genotype, plasmid profile, and bacteriophage lambda-restriction fragment length polymorphism profile
J. Infect. Dis. 168, 1300-1303
- PARRY, S.M., R.L. SALMON, G.A. WILLSHAW und T. CHEASTY (1998)
Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157
Lancet 351, 1019-1022
- PATON, A.W. und J.C. PATON (1996)
Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with case of haemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. 34, 463-465
- PATON, A.W., R.M. RATCLIFF, R.M. DOYLE, J. SEYMOUR-MURRAY, D. DAVOS, J.A. LANSER und J.C. PATON (1996)
Molecular microbiological investigation of an outbreak of haemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 34, 1622-1627
- PATON, A.W., E. VOSS, P.A. MANNING und J.C. PATON (1997)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells
Infect. Immun. 65, 3799-3805
- PATON, J.C. und A.W. PATON (1998)
Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections
Clin. Microbiol. Rev. 11, 450-479
- PETRIC, M., M.A. KARMALI, G.S. ARBUS, M. ROSCOE, S. LOUIE und R. CHEUNG (1987)
Effects of cycloheximide and puromycin on cytotoxic activity of *Escherichia coli* Verocytotoxin (Shiga-like toxin)
J. Clin. Microbiol. 25, 1265-1268
- PIÉRARD, D., L. HUYGHENS, S. LAUWERS und H. LIOR (1991)
Diarrhoe associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin
Lancet 338, 762
- PIÉRARD, D., L. VAN DAMME, L. MORIAU, D. STEVENS und S. LAUWERS (1997)
Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats
Appl. Environ. Microbiol. 63, 4585-4587

- PIÉRARD, D., G. MUYLDERMANS, L. MORIAU, D. STEVENS und S. LAUWERS (1998)
Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates
J. Clin. Microbiol. 36, 3317-3322
- PIRRO, F., L.H. WIELER, K. FAILING, R. BAUERFEIND und G. BALJER (1995)
Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle
Vet. Microbiol. 43, 131-141
- POHL, P.H., J.E. PEETERS, E.R., JACQUEMIN, P.F. LINTERMANS und J.G. MAINIL (1993)
Identification of eae sequences in enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits
Infect. Immun. 61, 2203-2206
- POLLARD, D.R., W.M., JOHNSON, H. LIOR, S.D. TYLER und K.R. ROZÉE (1990)
Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 28, 540-545
- POZZI, W., L. BEUTIN und H. WEBER (1996)
Überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst
Fleischwirtsch. 76, 1300-1311
- PRADEL, N., V. LIVRELLI, C. DE CHAMPS, J.B. PALCOUX, A. REYNAUD, F. SCHEUTZ, J. SIROT, B. JOLY und C. FORESTIER (2000)
Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France
J. Clin. Microbiol. 38, 1023-1031
- PRESTON, M.A., W. JOHNSON, R. KHAKHRIA und A. BORCZYK (2000)
Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field electrophoresis
J. Clin. Microbiol. 38, 2366-2368
- RADU, S., S.A. MUTALIB, G. RUSUL, Z. AHMAD, T. MORIGAKI, N. ASAI, Y. B. KIM, J. OKUDA und M. NISHIBUCHI (1998)
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1153-1156
- RAGHUBEER, E.V. und J.R. MATCHES (1990)
Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium
J. Clin. Microbiol. 28, 803-805
- RAHN, K., S.A. RENWICK, R.P. JOHNSON, J.B. WILSON, R.C. CLARKE, D. ALVES, S. MCEWEN, H. LIOR und J. SPIKA (1997)
Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment
Epidemiol. Infect. 119, 251-259
- RAMACHANDRAN, V., M.A. HORNITZKY, K.A. BETTELHEIM, M.J. WALKER, und S.P. DJORDJEVIC (2001)
The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type
J. Clin. Microbiol. 39, 1932-1937

- RASMUSSEN, M.A., W.C. CRAY, JR., T.A. CASEY und S.C. WHIPP (1993)
Rumen contents as a reservoir for enterohemorrhagic *Escherichia coli*
FEMS Microbiol. Lett. 114, 79-84
- REIDA, P., M. WOLFF, H.-W. POHLS, W. KUHLMANN, A. LEHMACHER, S. ALEKSIC, H. KARCH und J. BOCKEMÜHL (1994)
An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination
Zbl. Bakt. 281, 534-543
- REYMOND, D., R.P. JOHNSON, M.A. KARMALI, M. PETRIC, M. WINKLER, S. JOHNSON, K. RAHN, S. RENWICK, J. WILSON, R.C. CLARKE und J. SPIKA (1996)
Neutralizing antibodies to *Escherichia coli* Vero cytotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents
J. Clin. Microbiol. 34, 2053-2057
- RICE, D.H., K.M. MCMENAMIN, L.C. PRITCHETT, D.D. HANCOCK und T.E. BESSER (1999a)
Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms
Epidemiol. Infect. 122, 479-484
- RICE, E.W., R.M. CLARK und C.H. JOHNSON (1999b)
Chlorine inactivation of *E. coli* O157:H7
Emerg. Infect. Dis. 5, 461-463
- RICHTER, H., H. KLIE, M. TIMM, P. GALLIEN, H. STEINRÜCK, K.-W. PERLBERG und D. PROTZ (1997)
Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 121-127
- RICHTER, H., H. KLIE, M. TIMM, P. GALLIEN, K.-W. PERLBERG, P. TEUFEL, D. PROTZ und H. STEINRÜCK (1998)
Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC) in Milch, Fleisch und Wurst von Rindern als potentielle enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
RKI InfFo II, 3-5
- RILEY, L.W., R.S. REMIS, S.D. HELGERSON, H.B. MCGEE, J.G. WELLS, B.R. DAVIS, R.J. HEBERT, E.S. OLCOTT, L.M. JOHNSON, N.T. HARGRETT, P.A. BLAKE und M.L. COHEN (1983)
Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype
N. Engl. J. Med. 308, 681-685
- RÖMLING, U., R. FISLAGE und B. TÜMMLER (1995)
Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern
Immun. Infekt. 23, 4-8
- RÜSSMANN, H., H. SCHMIDT, J. HEESEMANN, A. CAPRIOLI und H. KARCH (1994)
Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome
J. Med. Microbiol. 40, 338-343

- RÜSSMANN, H., E. KOTHE, H. SCHMIDT, S. FRANKE, D. HARMSSEN, A. CAPRIOLI und H. KARCH (1995)
Genotyping of shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome
J. Med. Microbiol. 42, 404-410
- SAAD, S.M.I. und B.D.G.M. FRANCO (1999)
Influence of raw meat natural background flora on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef
Rev. Microbiol. 30, 272-277
- SAGE, J.R. und S.C. INGHAM (1998)
Evaluating survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen and thawed apple cider: potential use of a hydrophobic grid membrane filter-SD-39 agar method
J. Food Prot. 61, 490-494
- SAMADPOUR, M., L.M. GRIMM, B. DESAI, D. ALFI, J.E. ONGERTH und P.I. TARR (1993)
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 strains by bacteriophage γ restriction fragment length polymorphism analysis: application to a multistate foodborne outbreak and a day-care center cluster
J. Clin. Microbiol. 31, 3179-3183
- SAMADPOUR, M., J.E. ONGERTH, J. LISTON, N. TRAN, D. NGUYEN, T.S. WHITTAM, R.A. WILSON und P.I. TARR (1994)
Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1038-1040
- SAMUEL, J.E., L.P. PERERA, S. WARD, A.D. O'BRIEN, V. GINSBURG und H.C. KRIVAN (1990)
Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II variants
Infect. Immun. 58, 611-618
- SAVARINO, S.J., A. FASANO, D.C. ROBERTSON und M.M. LEVINE (1991)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model
J. Clin. Invest. 87, 1450-1455
- SAVARINO, S.J., A. McVEIGH, J. WATSON, J. MOLINA, A. CRAVIOTO, P. ECHEVERRIA, M.K. BHAN, M.M. LEVINE und A. FASANO (1996)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enterotoxigenic *Escherichia coli*
J. Infect. Dis. 173, 1019-1022
- SCHMIDT, H., M. MONTAG, J. BOCKENMÜHL, J. HEESEMANN und H. KARCH (1993)
Shiga-Like Toxin II-Related Cytotoxins in *Citrobacter freundii* Strains from Humans and Beef Samples
Infect. Immun. 61, 534-543
- SCHMIDT, H., H. RÜSSMANN, A. SCHWARZKOPF, S. ALEKSIC, J. HEESEMANN und H. KARCH (1994)
Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls
Zbl. Bakt. 281, 201-213

- SCHMIDT, H., L. BEUTIN und H. KARCH (1995)
Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933
Infect. Immun. 63, 1055-1061
- SCHMIDT, H. und H. KARCH (1996)
Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and haemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol., 34, 2364-2367
- SCHMIDT, H., C. KERNBACH und H. KARCH (1996)
Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
Microbiology 142, 907-914
- SCHMIDT, H., J. SCHEEF, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, L.H. WIELER und H. KARCH (2000)
A new Shiga toxin 2 variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons
Appl. Environ. Microbiol. 66, 1205-1208
- SCHOENI, J.L. und M.P. DOYLE (1994)
Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* and subsequent contamination of eggs
Appl. Environ. Microbiol. 60, 2958-2962
- SCHULTSZ, C., J. ENDE, F. COBELENS, T. VERVOORT, A. GOMPEL, J.C.F.M. WETSTEYN und J. DANKERT (2000)
Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers
J. Clin. Microbiol. 38, 3550-3554
- SCHWARTZ, D.C. und C.R. CANTOR (1984)
Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis
Cell 37, 67-75
- SCOTLAND, S.M., H.R. SMITH, B. ROWE (1985)
Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157
Lancet 19, 885-886
- SEMANCHEK, J.J. und D.A. GOLDEN (1998)
Influence of growth temperature on inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 by heat, acid, and freezing
J. Food Prot. 61, 395-401
- SEUFFER, R. (1997)
Verotoxin-produzierende *Escherichia coli* (VTEC = STEC)
ÄBW 11, 438-440
- SHERE, J.A., K.J. BARTLETT und C.W. KASPAR (1998)
Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1390-1399
- SIMMONS, N.A. (1997)
Global perspectives on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* spp.:UK views
J. Food Prot. 60, 1463-1465

- SKANDAMIS, P.N. und G.-J.E. NYCHAS (2000)
Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentration
Appl. Environ. Microbiol. 66, 1646-1653
- SMITH, D., G. WILLSHAW, J. STANLEY und C. ARNOLD (2000)
Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: comparison of isolates of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses
J. Clin. Microbiol. 38, 4616-4620
- SOFOS, J.N. und G.C. SMITH (1993)
A new problem
Meat Focus Int., 317-325
- SORDILLO, E.M. und M.E. NUSBAUM (1996)
Screening for *Escherichia coli* O157:H7—a nationwide survey of clinical laboratories
J. Clin. Microbiol. 34, 1868-1869
- SPIKA, J.S., J.E. PARSONS, D. NORDENBERG, J.G. WELLS, R.A. GUNN und P.A. BLAKE (1986)
Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center
J. Pediatr. 109, 287-291
- SPIKA, J.S., R.KHAKHRIA, P. MICHEL, D. MILLEY, J. WILSON und J. WATERS (1998)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canada
In: KAPER, J.B. und A.D. O'BRIEN, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM, Washington, 23-29
- STEPHAN, R. (1998)
Vorkommen verotoxinbildender *Escherichia coli* (VTEC) in Stuhlproben von Mitarbeitern lebensmittelverarbeitender Betriebe
Proc. 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 211-216
- STROCKBINE, N.A., L.R.M. MARQUES, R.K. HOLMES und A.D. O'BRIEN (1985)
Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*
Infect. Immun. 50, 695-700
- STROCKBINE, N.A., L.R.M. MARQUES, J.W. NEWLAND, H.W. SMITH, R.K. HOLMES und A.D. O'BRIEN (1986)
Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities
Infect. Immun. 53, 135-140
- STROCKBINE, N.A., J.G. WELLS, C.A. BOPP und T.J. BARRETT (1998)
Overview of detection and subtyping methods
In: KAPER, J.B. und A.D. O'BRIEN, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM, Washington
- SUTHERLAND, J.P., A.J. BAYLISS, D.S. BRAXTON und A.L. BEAUMONT (1997)
Predictive modelling of *Escherichia coli* O157:H7: inclusion of carbon dioxide as a fourth factor in a pre-existing model
Int. J. Food Microbiol. 37, 113-120

- SWERDLOW, D.L., B.A. WOODRUFF, R.C. BRADY, P.M. GRIFFIN, S. TIPPEN, H.D. DONNELL JR., E. GELDREICH, B.J. PAYNE, A. MEYER JR. und J.G. WELLS (1992)
A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death
Ann. Intern. Med. 117, 812-819
- SZABO, R.A., E.C.D. TODD und A. JEAN (1986)
Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food
J. Food Prot. 49, 768-772
- TAKEDA, T., K. YOSHINO, H. UCHIDA, N. IKEDA und M. TAINAMURA (1998)
Early use of fosfomycin for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection reduces the risk of hemolytic-uremic syndrome
In: KAPER, J.B. und A.D. O'BRIEN, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM, Washington, 385-387
- TARR, P.I., T.E. BESSER, D.D. HANCOCK, W.E. KEENE und M. GOLDOFT (1997)
Verotoxigenic *Escherichia coli* infection: U.S. overview
J. Food Prot. 60, 1466-1471
- TARR, P.I., L.M. SCHOENING, Y.L. YEA, T. WARD und T.S. WHITTAM (1999)
Acquisition of the *rfb-gnd* chromosomal region in the divergence of *Escherichia coli* O157:H7
Abstr. B/D-335, p. 95, Abstr. 99 th -Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1999. American Society for Microbiology, Chicago, Illinois
- TEEL, L.D., A.R. MELTON-CELSA, C.K. SCHMITT und A.D. O'BRIEN (2002)
One of two copies of the gene for the activatable Shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage
Infect. Immun. 70, 4282-4291
- TENOVER, F.C., R.D. ARBEIT, R.V. GOERING, P.A. MICKELSEN, B.E. MURRAY, D.H. PERSING und B. SWAMINATHAN (1995)
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing
J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239
- THOMAS, A., T. CHEASTY, J.A. FROST, H. CHART, H.R. SMITH und B. ROWE (1996)
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-4
Epidemiol. Infect. 117, 1-10
- THOMPSON, J.S., D.S. HODGE und A.A. BORCZYK (1990)
Rapid biochemical test to identify Verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157
J. Clin. Microbiol. 28, 2165-2168
- TOZZI, A.E., A. NICCOLINI, A. CAPRIOLI, I. LUZZI, G. MONTINI, G. ZACCHELLO, A. GIANVITI, F. PRINCIPATO und G. RIZZONI (1994)
A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months
Epidemiol. Infect. 113, 209-219
- TSAI, Y. und S.C. INGHAM (1997)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. In acidic condiments
J. Food Prot. 60, 751-755

- TYLER, K.D., G. WANG, S.D. TYLER und W.M. JOHNSON (1997)
Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens
J. Clin. Microbiol. 35, 339-346
- TZIPORI, S., H. KARCH, K.I. WACHSMUTH, R.M. ROBINS-BROWNE, A.D. O'BRIEN, H. LIOR, M.L. COHEN, J. SMITHERS und M.M. LEVINE (1987)
Role of a 60-Megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets
Infect. Immun. 55, 3117-3125
- ULJAS, H.E. und S.C. INGHAM (1998)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in synthetic gastric fluid after cold and acid habituation in apple juice or trypticase soy broth acidified with hydrochloric acid or organic acids
J. Food Prot. 61, 939-947
- VAN DUYNHOVEN, Y.T., C. DE JAGER, A.E. HEUVELINK, W.K. VAN DER ZWALUW, H.M. MAAS, W. VAN PELT, W.J. WANNET (2002)
Enhanced laboratory-based surveillance of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157 in the Netherlands
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21, 513-522
- VERNOZY-ROZAND, C., S. RAY-GUENIOT, C. RAGOT, C. BAVAI, C. MAZUY, M.P. MONTET, J. BOUVETB und Y. RICHARD (2002)
Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef
Lett. Appl. Microbiol. 35, 7-11
- VILA, J., M. VARGAS, J. RUIZ, F. GALLARDO, M.T. JIMENEZ DE ANTA und J. GASCON (1997)
Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* O-rough:K1:H7 from two patients with traveler's diarrhea
J. Clin. Microbiol. 35, 2279-2282
- WANG, G., T. ZHAO und M.P. DOYLE (1996)
Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces
Appl. Environ. Microbiol. 62, 2567-2570
- WANG, G. und M.P. DOYLE (1998)
Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water
J. Food Prot. 61, 662-667
- WARBURTON, D.W., J.W. AUSTIN, B.H. HARRISON und G. SANDERS (1998)
Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water
J. Food Prot. 61, 948-952
- WEBER, A., H. KLIE, H. RICHTER, P. GALLIEN, M. TIMM und K.-W. PERLBERG (1997)
Über die derzeitigen Probleme zum Auffinden von Infektiosquellen und Infektionsketten beim enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 211-213
- WEINSTEIN, D.L., R.K. HOLMES und A. D. O'BRIEN (1988)
Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*
Infect. Immun. 56, 106-111

- WELINDER-OLSSON, C., E. KJELLIN, M. BADENFORS und B. KAIJSER (2000)
Improved microbiological techniques using the polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for diagnosis and follow-up of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 843-851
- WELLS, J., B.R. DAVIS, I.K. WACHSMUTH, L.W. RILEY, R.S. REMIS, R. SOKOLOW und G.K. MORRIS (1983)
Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype
J. Clin. Microbiol. 18, 512-520
- WELLS, J.G., L.D. SHIPMAN, K.D. GREENE, E.G. SOWERS, J.H. GREEN, D.N. CAMERON, F.P. DOWNES, M.L. MARTIN, P.M. GRIFFIN, S.M. OSTROFF, M.E. POTTER, R.V. TAUXE und I.K. WACHSMUTH (1991)
Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle
J. Clin. Microbiol. 29, 985-989
- WHITTAM, T.S., I.K. WACHSMUTH und R.A. WILSON (1988)
Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome
J. Infect. Dis. 157, 1124-1133
- WHITTAM, T.S., M.L. WOLFE, I.K. WACHSMUTH, F. ØRSKOV, I. ØRSKOV und R.A. WILSON (1993)
Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea
Infect. Immun. 61, 1619-1629
- WHITTAM, T.S. (1998)
Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains
In: KAPER, J.B. und A.D. O'BRIEN, *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM, Washington, 195-209
- WIELER, L.H., R. BAUERFEIND und G. BALJER (1992)
Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea
Zbl. Bakt. 276, 243-253
- WIELER, L.H., E. VIELER, C. ERPENSTEIN, T. SCHLAPP, H. STEINRÜCK, R. BAUERFEIND, A. BYOMI und G. BALJER (1996)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes
J. Clin. Microbiol. 34, 2980-2984
- WIELER, L.H., A. SCHWANITZ, E. VIELER, B. BUSSE, H. STEINRÜCK, J.B. KAPER und G. BALJER (1998)
Virulence properties of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves
J. Clin. Microbiol. 36, 1604-1607
- WIELER, L.H., B. BUSSE, H. STEINRÜCK, L. BEUTIN, A. WEBER, H. KARCH und G. BALIER (2000)
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serogroup O118 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens
J. Clin. Microbiol. 38, 2162-2169

- WILLSHAW, G.A., S.M. SCOTLAND, H.R. SMITH und B. ROWE (1992)
Properties of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157
J. Infect. Dis. 166, 797-802
- WILLSHAW, G.A., H.R. SMITH, T. CHEASTY, P.G. WALL und B. ROWE (1997)
Vero cyto-toxin-producing *Escherichia coli* O157 outbreaks in England und Wales, 1995:phenotypic methods and genotypic subtyping
Emerging Infect. Dis. 3, 561-565
- WILLSHAW, G.A., H.R. SMITH, T. CHEASTY und S.J. O`BRIEN (2001)
Use of strain typing to provide evidence for specific interventions in the transmission of VTEC O157 infections
Int. J. Food Microbiol. 66, 39-46
- WILSON, J.B., R.P. JOHNSON, R.C. CLARKE, K. RAHN, S.A. RENWICK, D. ALVES, M.A. KARMALI, P. MICHEL, E. ORRBINE und J.S. SPIKA (1997)
Canadian perspectives on verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection
J. Food Prot. 60, 1451-1453
- WONG, C.S., S. JELACIC, R.L. HABEEB, S.L. WATKINS und P.I. TARR (2000)
The risk of hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections
N. Engl. J. Med. 342, 1930-1936
- YARON, S., G.L. KOLLING, L. SIMON und K.R. MATTHEWS (2000)
Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria
Appl. Environ Microbiol. 66, 4414-4420
- YEE, A.J., S. GRANDIS und C.L. GYLES (1993)
Mitomycin-induced synthesis of a Shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.I.8
Infect. Immun. 61, 4510-4513
- ZHANG, W., M. BIELAZEWSKA, T. KUCZIUS und H. KARCH (2002)
Identification, characterisation, and distribution of Shiga toxin 1 Gene variant (*stx*_{1c}) in *Escherichia coli* strains isolated from humans
J. Clin. Microbiol. 40, 1441-1446
- ZHAO, T., M.P. DOYLE und R.E. BESSER (1993)
Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7 in apple cider with and without preservatives
Appl. Environ. Microbiol. 59, 2526-2530
- ZHAO, T., M.P. DOYLE, B.G. HARMON, C.A. BROWN, P.O.E. MUELLER und A.H. PARKS (1998)
Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria
J. Clin. Microbiol. 36, 641-647
- ZSCHÖCK, M., A.A. AMR EL. SAYED und H.-P. HAMANN (1998)
Zum Vorkommen verotoxinbildender *Escherichia coli* (VTEC) bei der Mastitis des Rindes
Milchwissenschaft 53, 307-309

10 ANHANG

Anhangstabelle 10-1: Beziehung zwischen der Herkunft von einigen aus Stuhl von Patienten stammenden *E. coli* O157-Isolaten (n = 70), dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm *E. coli* O157 EDL 933, dem *Xba*I – Restriktionsfragmentmuster (RFM) und dem *p*-Gen-Profil

<i>Xba</i> I-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	<i>p</i> -Gen-typisierung
A4	HUS 1249	IHM Würzburg ¹⁾	Stuhl, HUS ²⁾	O157:H7	91,9 %	II
	E 1161	VGH Halifax	Stuhl, HC			II
	136/36	IHM Würzburg	Stuhl, HUS			VIII
	EDL 931	CDC Atlanta ⁶⁾	Stuhl, HC			II
	CI 8	HSC Toronto ⁹⁾	Stuhl, HUS			II
	CI 40	HSC Toronto	Stuhl, HUS			II
	B 1189-1	UHS Bethesda	Stuhl, HC			II
A5	E 1177	VGH Halifax	Stuhl, HC	O157:H7	86,5 %	II
A8	3978/91	IHM Würzburg	Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻	75,7 %	IV
A9	3232/96	IHM Würzburg	Stuhl, HUS	O157:H7	73,7 %	IV
A10	3075/96	IHM Würzburg	Stuhl, HUS	O157:H7	83,3 %	IX
	6504/95		Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻		X
	6292/95		Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻		X
A11	6652/95	IHM Würzburg	Stuhl, HUS	O157:H7	75,7 %	VIII

Fortsetzung Anhangstabelle 10-1:

XbaI-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Gen-typisierung
A14	C 999-87	SSI Kopenhagen	Stuhl, HC	O157:H7	78,9 %	IX
A15	C 1011-87	SSI Kopenhagen	Stuhl, HC	O157:H7	78,9 %	IX
	3746/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157		II
A16	C 1403-83	SSI Kopenhagen	Stuhl, HC	O157:H7	81,1 %	II
	NCTC 12079	CPHL, Colindale	Stuhl, HC oder HUS	O157:H7	81,1 %	II
A17	1271-84	CDC Atlanta	Stuhl, HUS	O157:H7	73,7 %	IV
A18	A 9047-CS1	UHS Bethesda ⁸⁾	Stuhl, HC	O157:H7	91,9 %	II
A19	B 2576	UHS Bethesda	Stuhl, HC	O157:H7	75,7 %	IV
	3806/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157		
	4427/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157		
	VD 1	Diepholz/Niedersachsen	Stuhl, erkrankt	O157:H7		
A20	3149-85	UHS Bethesda	Stuhl, HC	O157:H7	87,2 %	VI
A23	DSM 8579	DSM, Braunschweig ¹⁰⁾	Stuhl, Gastroenteritis	O157:H7	78,9 %	IV
A26	3656/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	76,9 %	II
	3736/97					
	3733/97					
	3744/97					

Fortsetzung Anhangstabelle 10-1:

XbaI-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Gen-typisierung
A26	3857/97	RKI Wernigerode ¹¹⁾	Stuhl, erkrankt	O157 ¹²⁾	76,9 %	II
	3737/97					
	4746/97					
	3803/97					
	3734/97					
	3738/97					
	3745/97					
	3655/97					
A27	3837/97 4460/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	82,1 %	II
A28	4596/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	78,9 %	II
A29	17069	IHM Würzburg	Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻	97,3 %	VIII
A31	6334/96	IHM Würzburg	Stuhl, erkrankt	O157:H7	76,9 %	II
A32	V 1/1	Vechta/Niedersachsen	Stuhl, erkrankt	O157:H7	75,7 %	II
A33	V 2/1	Vechta/Niedersachsen	Stuhl, erkrankt	O157:H7	73,7 %	II
A34	HC 2044	IHM Würzburg	Stuhl, HC ³⁾	O157:H7	100 %	VI

Fortsetzung Anhangstabelle 10-1:

XbaI-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Genotypisierung
A37	NCTC 12080	CPHL, Colindale ⁵⁾	Stuhl, HC oder HUS	O157:H ⁻	75,0 %	IX
A41	4747/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	80,0 %	II
A42	3617/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	86,5 %	II
A43	6216/96	IHM Würzburg	Stuhl, erkrankt	O157:H7	91,9 %	XI
A47	V 6/1	Vechta/Niedersachsen	Stuhl, erkrankt	O157:H7	76,9 %	IV
A48	E 1047	VGH Halifax ⁴⁾	Stuhl, HC	O157:H7	85,7 %	II
A49	3526-87	CDC Atlanta	Stuhl, HC	O157:H7	88,9 %	II
A50	CI 56	HSC Toronto	Stuhl, HUS	O157:H7	91,4 %	II
A51	3010/96	IHM Würzburg	Stuhl, HUS	O157:H7	83,3 %	XI
A52	38394/1 38394/6/1-1	Osnabrück/Niedersachsen	Stuhl, erkrankt	O157:H7	73,7 %	II
A53	C 7-80	SSI Kopenhagen ⁷⁾	Stuhl, HC	O157:H7	82,4 %	III
A54	CB 7060	RKI Berlin ¹³⁾	Stuhl, erkrankt	O157:H7	75,0 %	II
A56	E 4884	VGH Halifax	Stuhl, HC	O157:H7	86,5 %	II
A57	A 9167-1	UHS Bethesda	Stuhl, HC	O157:H7	81,1 %	XII
A58	3856/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	84,2 %	VIII

Fortsetzung Anhangstabelle 10-1:

Xbal- RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Gen- typisierung
A59	W1	Hannover/Niedersachsen	Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻	78,9 %	II
A61	2575/97	RKI Wernigerode	Stuhl, erkrankt	O157	73,7 %	IX
	1104/96	IHM Würzburg	Stuhl, HUS	O157		
	7579/95	IHM Würzburg	Stuhl, HUS	O157:H ⁻		
B1	RL 105/96	RKI Berlin	Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻	60,0 %	V
	RL 106/96	RKI Berlin	Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻		
	RL 107/96	RKI Berlin	Stuhl, erkrankt	O157:H ⁻		

¹⁾ Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg

²⁾ Hämolytisch-Urämisches Syndrom

³⁾ Hämorrhagische Colitis

⁴⁾ Victoria General Hospital Halifax, Kanada

⁵⁾ Public Health Laboratory Colindale, Scotland

⁶⁾ Center for Disease Control and Prevention, Atlanta USA

⁷⁾ Status Serum Institut Kopenhagen, Dänemark

⁸⁾ University of the Health Sciences, Bethesda USA

⁹⁾ Hospital for sick children Toronto, Kanada

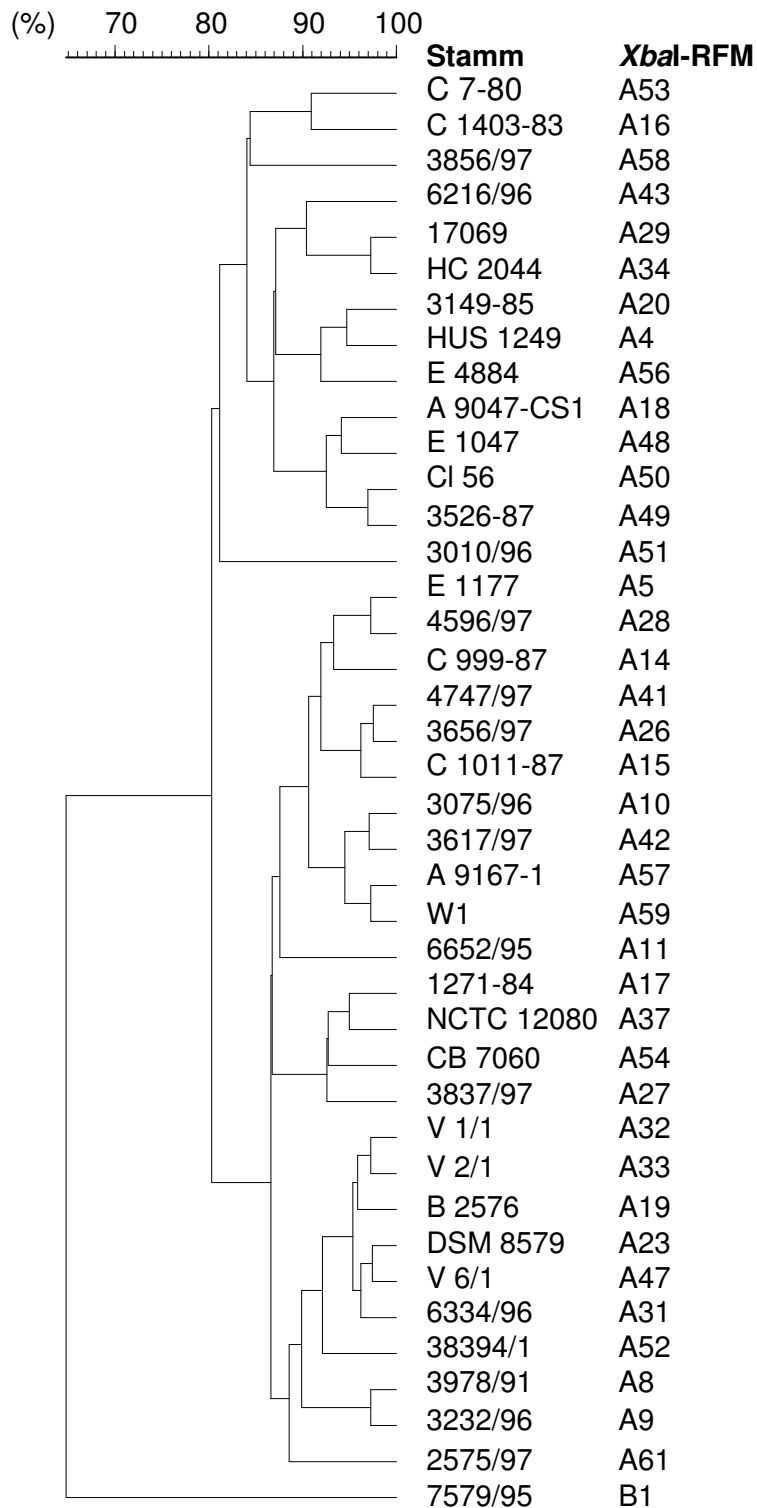
¹⁰⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

¹¹⁾ Robert Koch Institut Wernigerode, Sachsen-Anhalt

¹²⁾ *E. coli* O157 Latex-Agglutinationstest

¹³⁾ Robert Koch Institut Berlin

Anhangsabbildung 10-1: Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 40 mittels PFGE (Verdau mit *Xba*I) untersuchten *E. coli* O157-Isolaten aus Stuhl von Patienten; enthalten sind alle 40 unterschiedlichen *Xba*I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)



Anhangstabelle 10-2: Beziehung zwischen dem *Xba*I – Restriktionsfragmentmuster (RFM) von einigen aus Stuhl von symptomlosen Ausscheidern stammenden *E. coli* O157-Isolaten (n = 12), der Herkunft, dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm *E. coli* O157 EDL 933 und dem *p*-Gen-Profil

XbaI-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Gen-typisierung
A2	12/4	BAFF Kulmbach ¹⁾	Stuhl, sA ²⁾ -Mitarbeiter 1	O157:H7	85,7 %	I
A4	12/1	BAFF Kulmbach	Stuhl, sA - Mitarbeiter 1	O157:H7	91,9 %	II
A6	26/22	BAFF Kulmbach	Stuhl, sA -Mitarbeiter 2	O157:H7	86,5 %	VIII
	1-2-3-6/9		Stuhl, sA	O157 ⁴⁾		
	1-2-3-6/14		Stuhl, sA	O157		
	1-2-3-6/15		Stuhl, sA	O157		
	1-2-3-6/83b		Stuhl, sA	O157		
A34	12/5	BAFF Kulmbach	Stuhl, sA -Mitarbeiter 1	O157:H7	100 %	VI
A35	VW Stuhl I	IFHT Berlin ¹⁾	Stuhl, sA	O157:H7	88,9 %	I
A36	12/7	BAFF Kulmbach	Stuhl, sA -Mitarbeiter 1	O157:H7	97,3 %	VI
A60	14/SLB	ILH Zürich	Stuhl, sA	O157:H7	81,1 %	XVII
B2	791/98	ILH Zürich ⁵⁾	Stuhl, sA	O157:H7	70,3 %	XV

¹⁾ Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

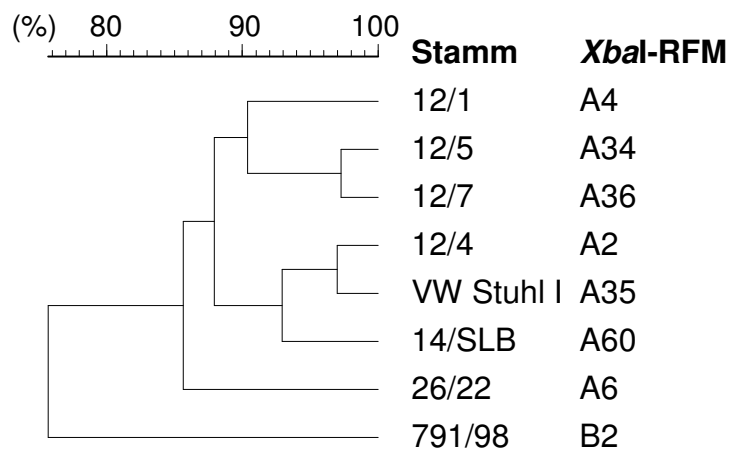
²⁾ symptomlose Ausscheider

³⁾ Institut für Fleischhygiene und -technologie, Freie Universität Berlin

⁴⁾ *E. coli* O157 Latex-Agglutinationstest

⁵⁾ Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich

Anhangsabbildung 10-2: Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 8 mittels PFGE (Verdau mit *Xba*I) untersuchten *E. coli* O157-Isolaten aus Stuhl von symptomlosen Ausscheidern; enthalten sind alle 8 unterschiedlichen *Xba*I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)



Anhangstabelle 10-3: Beziehung zwischen dem *Xba*I – Restriktionsfragmentmuster (RFM) von einigen aus Lebensmitteln stammenden *E. coli* O157-Isolaten (n = 41), der Herkunft, dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm *E. coli* O157 EDL 933 und dem *p*-Gen-Profil

<i>Xba</i> I-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	<i>p</i> -Gen-Profil
A2	D1 BU 1464/3	IFTN Gießen ¹⁾ LUA Halle ²⁾	Bratwurst Rindfleisch	O157:H- O157 ³⁾	85,7 %	I
A3	Sal 4/LXIV/1	IFTN Gießen	Rindfleisch	O157:H7	81,1 %	II
A4	3873 5/1 B569797 LM 284/97 7301/2	LUA Halle SVLUA Cottbus ⁴⁾ SVLUA Cottbus LVLUA Halle	Rohmilch Wildschweinfleisch Rohmilch, Rind Rindfleisch	O157:H7 O157:H O157 O157	91,9 %	II
A7	BU 1464/2	LUA Halle	Rindfleisch	O157:H7	83,3 %	I
A12	E 140 E 144	Madison USA Madison USA	Salami Schweinefleisch	O157:H7	94,7 %	VI
A13	E 142	Madison USA	Rindfleisch	O157:H7	89,5 %	VI
A21	C 12 KJS C 13 KJS	KJS München ⁵⁾	Salami	O157:H7	86,5 %	II
A22	C 14 KJS	KJS München	Hackfleisch	O157:H7	86,5 %	II
A23	L 694/98- SK1 L 694/98-SK4	SVUA Detmold ⁶⁾ SVUA Detmold	Rohmilch, Rind Rohmilch, Rind	O157 O157	78,9 % 78,9 %	IV IV
A34	EDL 933	UHS Bethesda ⁷⁾	Hamburger	O157:H7	100 %	VI

Fortsetzung Anhangstabelle 10-3:

Xbal-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Gen- Profil
A37	1997/05490/1-1/7	LUA Oldenburg ⁸⁾	Rohmilch, Rind	O157:H ⁻	75,0 %	IX
	C 7 KJS	KJS München	Lebensmittel	O157:H7		
	740	MUA Frankfurt ⁹⁾	Rohmilch	O157:H7 ¹⁰⁾		
	R4	MUA Frankfurt	Schafffleisch	O157:H7 ¹⁰⁾		
	654	MUA Frankfurt	gem. Hackfleisch	O157:H7 ¹⁰⁾		
	730	MUA Frankfurt	Lammfleisch	O157:H7 ¹⁰⁾		
	1204	MUA Frankfurt	Rohmilch	O157:H7 ¹⁰⁾		
A38	E 141	Madison USA	Apfelcidre	O157:H7	89,5 %	IV
A39	C 9 KJS	KJS München	Apfelcidre	O157:H7	87,2 %	XIII
A55	Sal 57/4/1-99	IFTN Gießen	Rindfleisch	O157:H7	91,9 %	XVI
B7	86-62374.96 -2	ILAT Berlin ¹¹⁾	gem. Hackfleisch	O157:H ⁻	66,7 %	VII
	86-62374.96 -3	ILAT Berlin	gem. Hackfleisch			
	SK2	Berlin	Rind- und Schweinefleisch			
	SK3	Berlin	Rind- und Schweinefleisch			
B8	H 4	IFTN Gießen	Rindfleisch	O157:H16	73,7 %	VII
B9	Schu 1	IFTN Gießen	Rindfleisch	O157	75,7 %	VII
	Schu 2			O157:H16		
B10	Schu 3	IFTN Gießen	Rindfleisch	O157	77,8 %	VII
B11	326 HF	ILH Zürich ¹²⁾	Hackfleisch	O157:H38	63,2 %	XIX
	327 HF					

Fortsetzung Anhangstabelle 10-3:

<i>Xba</i>I-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	<i>p</i>-Gen-Profil
B16	E 214 E 213	BAFF Kulmbach ¹³⁾	Teewurst	O157:H7	57,1 %	XIV
B17	E 205	BAFF Kulmbach	Teewurst	O157	62,9 %	XVI
B18	#51	LHTM München ¹⁴⁾	Rohmilch	O157:H ⁻	68,6 %	XIX

¹⁾ Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen

²⁾ Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt, Halle, Sachsen-Anhalt

³⁾ *E. coli* O157 Latex-Agglutinationstest

⁴⁾ Staatliches Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Cottbus, Brandenburg

⁵⁾ Kraft Jakobs Suchard, München

⁶⁾ Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Detmold, Nordrhein-Westfalen

⁷⁾ University of the Health Sciences, Bethesda, USA

⁸⁾ Staatliche Lebensmitteluntersuchungsamt Oldenburg, Niedersachsen

⁹⁾ Staatl. Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Südhessen – Außenstelle Frankfurt/M- Abt.: VI Lebensmittelüberwachung

¹⁰⁾ wurden später als *E. coli* O157:H⁻ serotypisiert, vermutlich haben diese Stämme die Genexpressionskapazität für das Flagellinantigen verloren

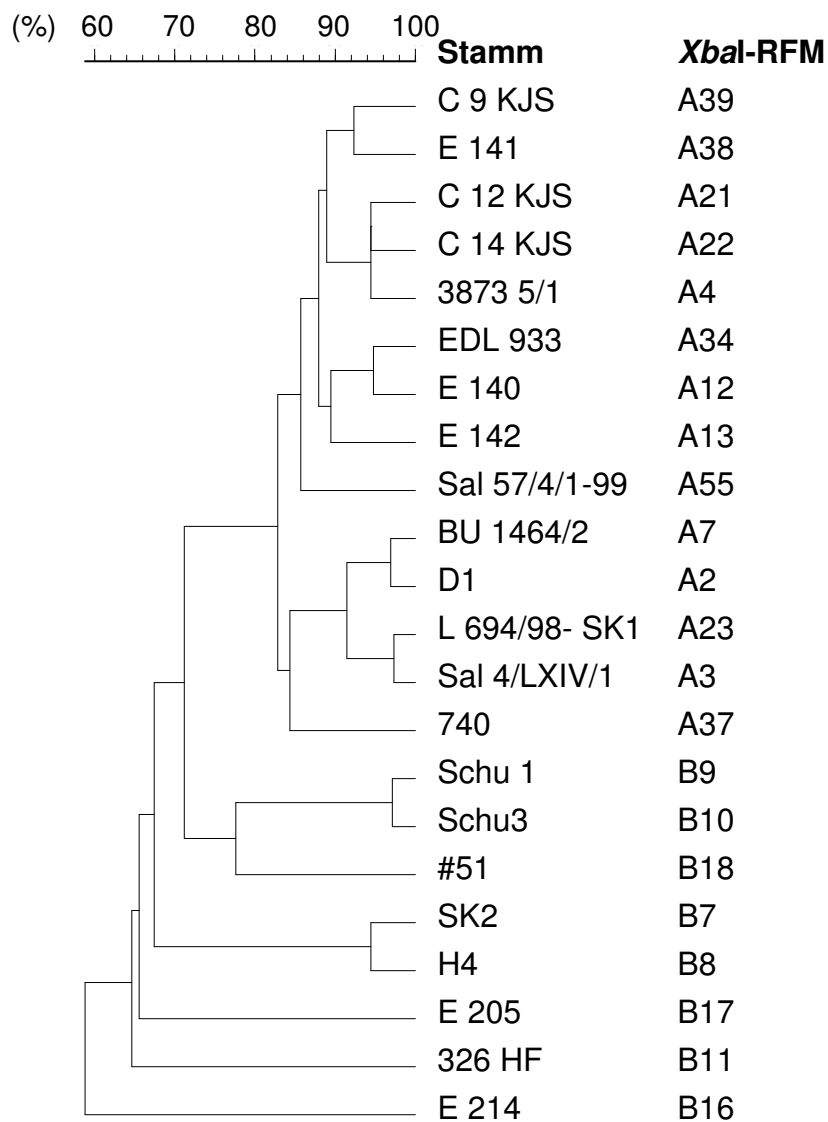
¹¹⁾ Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen, Berlin

¹²⁾ Institut für Lebensmittelsicherheit und –Hygiene der Universität Zürich

¹³⁾ Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

¹⁴⁾ Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München – Dr. Heinz Becker

Anhangsabbildung 10-3: Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 22 mittels PFGE (Verdau mit *Xba*I) untersuchten *E. coli* O157-Isolaten aus Lebensmitteln; enthalten sind alle 22 unterschiedlichen *Xba*I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)



Anhangstabelle 10-4: Beziehung zwischen dem *Xba*I-Restriktionsfragmentmuster (RFM) der 51 aus Tierkot stammenden *E. coli* O157-Isolate, der Herkunft, dem Isolationsmaterial, dem Serovar, dem Dice-Koeffizient im Vergleich zu Stamm *E. coli* O157 EDL 933 und dem *p*-Gen-Profil

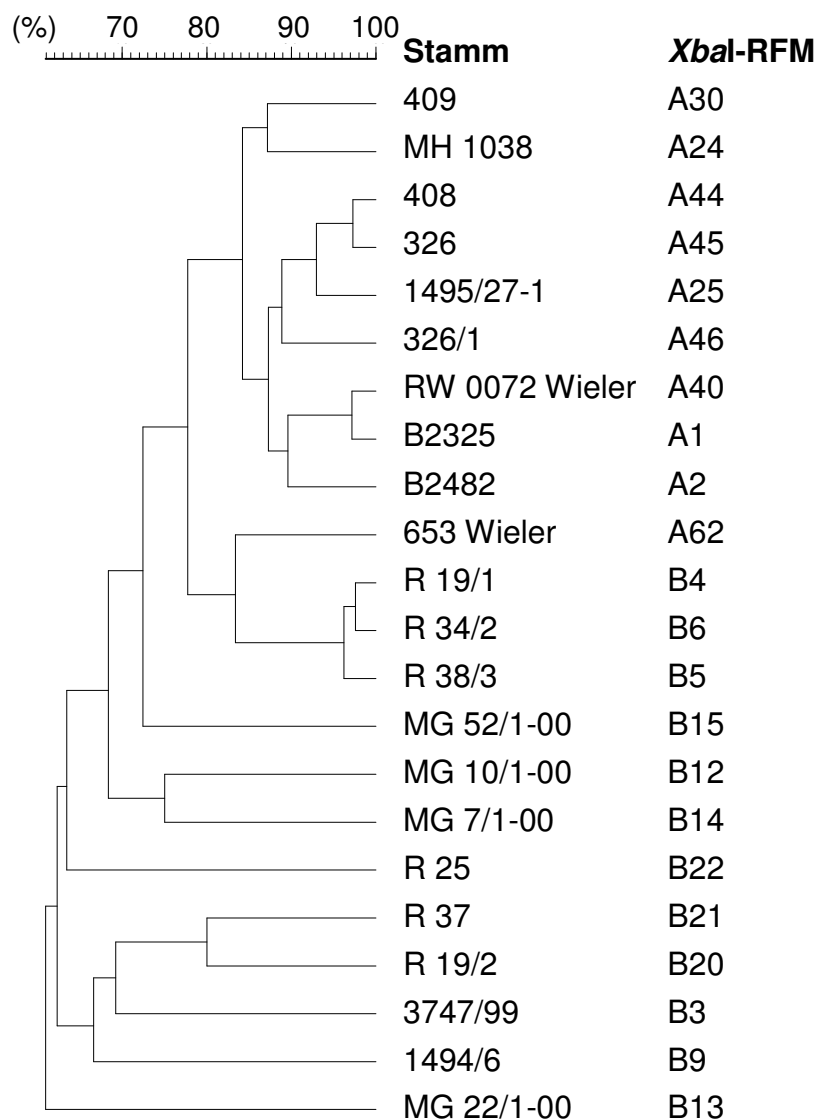
<i>Xba</i> I-RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice-Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	<i>p</i> -Gen-Profil
A1	B 2325	IFHT Berlin ¹⁾	Rinderkot	O157:H7	83,3 %	I
	B 2324	IFHT Berlin				
	E 124	BAFF Kulmbach ²⁾				
A2	B 2482	IFHT Berlin	Rinderkot	O157:H7	85,7 %	I
A24	MH 1038	VUA Oldenburg ³⁾	Rinderkot	O157:H7	78,9 %	II
A25	1495/27-1	LUA Nürnberg ⁴⁾	Rinderkot	O157:H ⁻	83,3 %	VIII
	1495/27-2					
A30	409	NVRI Pulawy ⁵⁾	Rinderkot	O157:H7	76,9 %	II
	409/1					
A40	RW 0072 Wieler	Gießen	Kälberkot	O157:H7	86,5 %	I
A44	408	NVRI Pulawy	Rinderkot	O157:H7	86,5 %	II
A45	326	NVRI Pulawy	Rinderkot	O157:H ⁻	84,2 %	II
A46	326/1	NVRI Pulawy	Rinderkot	O157:H7	80,0 %	II
A62	653 Wieler	Gießen	Kälberkot	O157:H7	80,0 %	XVIII
B3	3547/99	IHM Würzburg ⁶⁾	Minipferdekot	O157:H ⁻	60,0 %	V
B4	R 19/1	Rudlos	Rinderkot	O157 ⁷⁾	76,9 %	n.u.
	R 27					
	R 28/1					
	R 34/1					
	R 35/1					
	R 36					
	R 38/2					
	R 46					
B5	R 39/1	Rudlos	Rinderkot	O157:H7	78,9 %	n.u.
	R 38/3					
B6	R 34/2	Rudlos	Rinderkot	O157	75,0 %	n.u.

Fortsetzung Anhangstabelle 10-4:

Xbal- RFM	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	Serovar	Dice- Koeffizient im Vergleich zu EDL 933	p-Gen- Profil
B9	1494/6	LUA Nürnberg	Hundekot	O157:H ⁻	48,5 %	XIX
B12	MG 10/1-00 MG 23/1-00	IFTN Gießen ⁸⁾	Pferdekot	O157	68,6 %	XIX
B13	MG 22/1-00	IFTN Gießen	Pferdekot	O157	57,1 %	XIX
B14	MG 7/1-00	IFTN Gießen	Pferdekot	O157	68,6 %	XIX
B15	MG 52/1-00	IFTN Gießen	Pferdekot	O157	70,3 %	XIX
B20	R 19/2	Rudlos	Rinderkot	O157:H12	62,5 %	n.u.
	R 18					
	R 26					
	R 37					
	R 38/1					
B21	R 43	Rudlos	Rinderkot	O157:H12	61,1 %	n.u.
	R 44					
	R 45					
	R 54					
	R 11					
	R 13					
	R 15					
	R 24					
	R 39/2					
	R 60					
B22	R 25	Rudlos	Rinderkot	O157:H3	66,7 %	n.u.

¹⁾ Institut für Fleischhygiene und -technologie, Freie Universität Berlin²⁾ Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach³⁾ Staatliche Veterinäruntersuchungsamt Oldenburg, Niedersachsen⁴⁾ Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern – Nürnberg⁵⁾ National Veterinary Research Institute Pulawy, Polen⁶⁾ Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg⁷⁾ *E. coli* O157 Latex-Agglutinationstest und PCR mit Gi I/IIa-Primern⁸⁾ Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen

Anhangsabbildung 10-4: Dendrogramm der genetischen Verwandtschaft von 22 mittels PFGE (Verdau mit *Xba*I) untersuchten *E. coli* O157-Isolaten aus Tierkot; enthalten sind alle 22 unterschiedlichen *Xba*I-RFM, welche bei dieser Gruppe gefunden wurden (dargestellt anhand des Dice-Koeffizienten mit 1,2%iger Toleranz)



Anhangstabelle 10-5: Beziehung zwischen dem *p*-Gen-Profil, dem Probenmaterial, sowie dem Isolationsort und –land der 145 untersuchten *E. coli* O157-Stämme (einschließlich Stamm NCTC 12900)

<i>p</i>-Gen-Profil	Stämme (n)¹⁾	Lebensmittel (n)	Stuhl (n)	Kot (n)	Ort (N)²⁾	Land
I	10	3	2	5	4	D ³⁾
II	54	8	40	6	19	D, S ⁴⁾ , Dä ⁵⁾ , USA ⁶⁾ , K ⁷⁾ , P ⁸⁾
III	1	-	1	-	1	Dä
IV	12	3	9	-	9	D, USA
V	6	-	5	1	2	D
VI	8	4	4	-	4	D, USA
VII	8	8	-	-	2	D
VIII	11	-	9	2	4	D
IX	12	7	5	-	7	D, Dä, S
X	2	-	2	-	1	D
XI	2	-	2	-	1	D
XII	1	-	1	-	1	USA
XIII	1	1	-	-	1	D
XIV	2	2	-	-	1	D
XV	1	-	1	-	1	CH ⁹⁾
XVI	2	2	-	-	2	D
XVII*	2	-	1	-	2	CH, S
XVIII	1	-	-	1	1	D
XIX	9	3	-	6	4	D, CH

* der Labortamm NCTC 12900 gehört zu diesem Profil; sein Isolationsmaterial ist nicht hier definiert

¹⁾ Anzahl der Stämme

²⁾ Anzahl der Orte, wo diese Stämme isoliert wurden

³⁾ Deutschland

⁴⁾ Schottland

⁵⁾ Dänemark

⁶⁾ Vereinigte Staaten von Amerika

⁷⁾ Kanada

⁸⁾ Polen

⁹⁾ Schweiz

Anhangstabelle 10-6: Beziehung zwischen dem 85 *Xba*I-RFM, dem *p*-Gen-Profil, dem PCR-Ergebnis, der β -D-Glucuronidase-Aktivität (MUG) und der Sorbit-Fermentierung der 175 (einschließlich Stamm NCTC 12900) untersuchten *E. coli* O157-Stämme

<i>Xba</i>I-RFM	<i>p</i>-Gen-Profil	PCR	Sorbit	MUG	Stämme (n)¹⁾
A1	I	<i>vtx2c</i>	- ²⁾	-	3
A2	I	<i>vtx1 vtx2c</i> (n = 1) <i>vtx2c</i> (n = 3)	-	-	4
A3	II	<i>vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A4	II (n = 11) VIII (n = 1)	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	12
A5	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A6	VIII	<i>vtx1 vtx2c</i>	-	-	5
A7	I	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A8	IV	<i>vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A9	IV	<i>vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A10	IX (n = 1) X (n = 2)	<i>vtx2 vtx2c</i>			3
A11	VIII	<i>vtx1 vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A12	VI	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	2
A13	VI	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A14	IX	<i>vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A15	II (n = 1) IX (n = 1)	<i>vtx2 vtx2c</i> (n = 1) <i>vtx2</i> (n = 1)	-	-	2
A16	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	2
A17	IV	<i>vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A18	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A19	IV	<i>vtx2</i>	-	-	4
A20	VI	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A21	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	2
A22	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A23	IV	<i>vtx2</i>	-	-	3
A24	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A25	VIII	<i>vtx1 vtx2c</i>	-	-	2
A26	II	<i>vtx2</i> (n = 6) <i>vtx2 vtx2c</i> (n = 6)	-	-	12

Fortsetzung Anhangstabelle 10-6:

XbaI-RFM	p-Gen-Profil	PCR	Sorbit	MUG	Stämme (n)
A27	II	<i>vtx2</i>	-	-	2
A28	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A29	VIII	<i>vtx1 vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A30	II	<i>vtx2 vtx2c</i>	-	-	2
A31	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A32	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A33	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A34	VI	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	3
A35	I	<i>vtx2</i>	-	-	1
A36	VI	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A37	IX	<i>vtx2 vtx2c</i> (n = 7) <i>vtx2</i> (n = 1)	-	-	8
A38	IV	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A39	XIII	-	-	-	1
A40	I	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A41	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A42	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A43	XI	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A44	II	<i>vtx1</i>	-	-	1
A45	II	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A46	II	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A47	IV	<i>vtx2</i>	-	-	1
A48	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A49	II	<i>vtx1 vtx2 vtx2c</i>	-	-	1
A50	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1
A51	XI	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A52	II	<i>vtx2</i>	+ ³⁾ (n = 1) - (n = 1)	-	2
A53	III	<i>vtx1 vtx2c</i>	-	-	1
A54	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A55	XVI	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A56	II	<i>vtx1 vtx2</i>	-	-	1

Fortsetzung Anhangstabelle 10-6:

XbaI-RFM	p-Gen-Profil	PCR	Sorbit	MUG	Stämme (n)
A57	XII	<i>vtx1 vtx2c</i>	-	-	1
A58	VIII	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A59	II	<i>vtx2</i>	-	-	1
A60	XVII	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A61	IX	<i>vtx2</i>	-	-	1
A62	XVIII	<i>vtx2c</i>	-	-	1
A63	XVII	-	-	-	1
B1	V	<i>vtx2</i>	- (n = 3) + (n = 2)	+	5
B2	XV	<i>vtx2c</i>	-	-	1
B3	V	<i>vtx2</i>	+	+	1
B4	n.u. ⁴⁾	<i>vtx2c</i>	-	-	9
B5	n.u.	<i>vtx2c</i>	-	-	1
B6	n.u.	<i>vtx2c</i>	-	-	1
B7	VII	-	-	+	4
B8	VII	-	-	+	1
B9	VII	-	-	+	2
B10	VII	-	-	+	1
B11	XIX	-	+	+	2
B12	XIX	-	-	+	2
B13	XIX	-	+	+	1
B14	XIX	-	+	+	1
B15	XIX	-	+	+	1
B16	XIV	-	+	+	2
B17	XVI	-	+	+	1
B18	XIX	-	+	+	1
B19	XIX	-	+	+	1
B20	n.u.	-	+	+	3
B21	n.u.	-	+	+	12
B22	n.u.	-	+	+	4

¹⁾ Anzahl der Stämme²⁾ negatives Ergebnis³⁾ positives Ergebnis⁴⁾ nicht untersucht

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Bülte für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Unterstützung und kritischen Ratschläge, sowie die damit verbundene Zeit, die er mir bei dieser Arbeit gewidmet hat.

Beim „Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior“ (CAPES) möchte ich mich bedanken für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums, dass die Durchführung und erfolgreiche Beendigung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Amir Abdulmawjood für die Einführung in die molekularbiologische Techniken, für praktische Unterstützung und für seine hilfreichen Vorschläge.

Melanie danke ich herzlich für die grammatikalische Korrektur des Manuskripts („Übersetzung ins Hochdeutsch“) und für ihre freundschaftliche Hilfe auch bei technischen Problemen.

Weiterhin bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, die mich im Rahmen dieser Arbeit durch ihre ständige Hilfsbereitschaft bei kleinen und großen Problemen unterstützten und für ihre wertvolle technische Hilfen.

Meiner Freunde Vanessa und Holger danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfe bei der Bewältigung meiner Schwierigkeiten mit der deutschen Sprache.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Schwester und brasilianischen Freunden: „Maninhas e amigos, obrigada pelo carinho que me ajudou a enfrentar as dificuldades“.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und Kenio:

“Papitos, muito obrigada pelo apoio sentimental, moral e financeiro, pela credibilidade e estímulo no meu futuro científico.”

“Ke, obrigada pela sua companhia, ajuda e sobretudo pelo seu amor”